

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Paulo Sérgio Castilho Preté

**Solubilização de membranas eritrocitárias: análise
quantitativa do efeito hemolítico induzido por surfatantes**

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Biologia Funcional e
Molecular, na área de Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Eneida de Paula

2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

P926s

Preté, Paulo Sérgio Castilho

Solubilização de membranas eritrocitárias: análise quantitativa do efeito hemolítico induzido por surfatantes / Paulo Sérgio Castilho Preté. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientadora: Eneida de Paula.

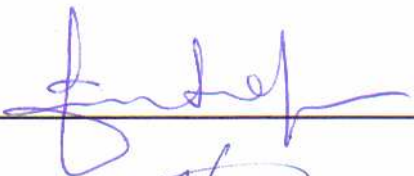
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Eritrócitos. 2. Hemólise e hemolisinas. 3. Agentes ativos de superfícies. 4. Membranas de eritrócitos. 5. Ressonância paramagnética eletrônica.
I. Paula, Eneida de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.


Data da Defesa: 28 / 06 / 2006.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Eneida de Paula (Orientadora)



Prof. Dr. Antônio Alonso



Prof. Dr. Hiroshi Aoyama



Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto



Profa. Dra. Maria Lucia Bianconi



Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo

Prof. Dr. Eduardo Galembeck

Prof. Dr. Pietro Ciancaglini



Dedicado as mais belas flores do meu jardim... meu pai, Castilho e ao meu sobrinho, Luis Fernando, que junto de Deus cultivam os jardins do céu e a minha mãe, que junto de nós cultiva a mais bela das flores, o AMOR...

AGRADECIMENTOS

“Amigos são anjos que nos deixam em pé quando nossas asas têm problemas em se lembrar de como voarem” *Infelizmente o autor é desconhecido.*

A meus amados pais, Castilho (in memorian), Zefinha, irmãos (Só, Tatão, Nica, Tico, Marcos, Fernando e Mara) e sobrinhos (Luis Fernando (in memorian), Vanessa, Adriane, Érika, Diego, Mariane, Bruna e Murillo)) pelo amor, confiança, ensinamentos, companheirismo e apoio que sempre recebo. AMO VOCÊS!!! ♥

À Profa. Dra. Ana Célia Ruggiero e Maria de Fátima Nepomuceno pela orientação, colaboração, sugestões, atenção e amizade durante a minha iniciação, onde tudo começou. A vocês minha eterna gratidão.

À Profa. Dra. Eneida de Paula pela orientação, colaboração, sugestões, atenção e amizade durante esses muitos anos. Essas palavras não dizem nada, diante do que sinto por você. Minha gratidão será eterna, minha adorada enfermeira.

À Profa. Dra. Nilce Corrêa Meirelles pela contribuição profissional e pessoal durante os anos, pelas terapias e pelo grande amor também!

À Profa. Dra. Cassiana Maria Reganham Coneglian, coordenadora do curso de Saneamento Ambiental (Ceset/Unicamp), pela confiança no meu trabalho e disponibilidade de sempre!

À Prof. Dra. Shirley, obrigado pelas oportunidades e momentos de aprendizado na USP. Seu enorme respeito aos animais me mostraram seu verdadeiro valor.

À Marina e Andréa, sempre resolvendo meus abacaxis! Obrigado minhas queridas, adoradas amigas!

*Ao **Laboratório de Biomembranas...** devo uma parte dos momentos inesquecíveis que vivi. Encontrei amigos que sempre vou guardar em meu coração. Agradeço não só pelas conversas de trabalho, mas especialmente pelas risadas...afinal, tudo sempre acabou assim: ☺!*

- Japinha, minha irmãzinha japoneusa... obrigado pela amizade, carinho, apoio, pelas conversas, colo, companheirismo, risadas, filmes, festas. Você esteve presente desde o começo, agora com o Tatsuo.

- *Murango, atualmente conhecida como "Fragola" minha outra irmãzinha... obrigado pela amizade, carinho, apoio, pelas conversas (e brigas também...), colo, companheirismo, almoços, jantares, filmes. Obrigado ermã!!! Te amo!!!*
- *Granja, meu amigo-irmão, pelas viagens e boas risadas de sempre.*
- *Zeca, meu amigo-irmão, obrigado pela amizade, carinho, conversas e pela sinceridade de sempre.*
- *Karina, minha primeira aluna de iniciação, agradeço a amizade durante todo o tempo que trabalhamos juntos.*
- *Hayda, minha segunda aluna, agradeço por nossas conversas, festas e prêmios que recebemos juntos.*
- *José, a terceira aluna, agradeço pelas conversas e pela garra que você tem. Aprendi com você, mais do que ensinei.*
- *Marizoca, pela amizade e perseverança de sempre. Mesmo estando longe, estamos perto.*
- *Eduardo, agradeço a amizade, consideração, esclarecimentos e os favores também.*
- *Léo, agradeço a amizade, favores e profissionalismo.*
- *Sônia, agradeço pelos bons e maus momentos. Todos nos fazem crescer!*
- *Ju, Bispo, Cleyton, Raquel, Veruska, André, Ana Cláudia, Luciana, obrigado pelas risadas, amizade e almoços...*
- *Márcio, Jack, Carlos, Dani-Viu, Maribel, Dona Cidinha obrigado pelo auxílio que recebi durante todo esse tempo e por tentarem manter "nosso hospício" um pouco organizado, obrigado pelos cafés também.*
- *Marcos Zardetto, agradeço pelo companheirismo de sempre. À você o meu respeito.*
- *Às amigas Cristina, Sílvia, Adriana e Neusa, obrigado pela amizade e oportunidades de trabalho.*
- *Giovana, pelos cafés dos momentos finais da escrita.*

- *Enfim, às "famílias" que adotei (Juli e Mayara, Stela, Eneida, Lee, Cae, Luciana, Ed, DeLucca, Patrícia, Cíntia, Marina, Helenice, Sr. Valdir). Obrigado por conhecê-los e por fazerem parte de muitos momentos felizes.*

Paulo (Pô)

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Surfatantes.....	6
1.2 Classificação dos surfatantes.....	6
1.3 Propriedades Físico-Químicas dos surfatantes.....	9
1.3.1 Concentração Micelar Crítica (CMC).....	9
1.3.2 Número de Agregação (N).....	10
1.3.3 Balanço Hidrofílico-Lipofílico (HLB).....	11
1.4 Surfatantes e suas aplicações.....	12
1.4.1 Surfatantes não iônicos da série C _x E _y	12
1.4.2 Surfatantes não iônicos da série Renex.....	13
1.4.3 Surfatantes não iônicos da série Tween.....	14
1.4.4 Sais biliares.....	14
1.5 Membranas Biológicas.....	15
1.5.1 Membrana Eritrocitária.....	18
1.5.2 Interação de Surfatantes não-iônicos com Membranas.....	22
1.5.3 Hemólise Isotônica.....	26
2 OBJETIVOS	32
3 MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 Materiais	33
3.2 Métodos	33
3.2.1 Caracterização Óptica dos Surfactantes	33
3.2.2 Testes de Autoxidação dos Surfactantes	34
3.2.3 Preparo da Suspensão de Eritrócitos	34
3.2.4 Teste Hemolíticos em meio isotônico	34
3.2.5 Tratamento de Lichtenberg	35
3.2.6 Estudos de EPR	36
4 RESULTADOS	39
4.1 Quantitative assessment of human erythrocyte membrane solubilization by Triton X-100.....	40
4.2 Solubilization of human erythrocyte membranes by non-ionic surfactants of the polyoxyethylene alkyl ethers series.....	46
4.3 Multiple stages of detergent-erythrocyte membrane interaction – A spin label study.....	57
4.4 Testes Hemolíticos em isotônicas com surfatantes não iônicos da série C ₁₂ E _y , série Renex,série Tween e Sais biliares.....	83
5 CONCLUSÕES	96
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
7 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	109

LISTA DE ABREVIATURAS

(BPS)	Surfataentes biodegradáveis e sensíveis ao pH
C_xE_y	Polioxietileno alquil éteres
$C_{10}E_8$	Polioxietileno 8 decil éter
$C_{12}E_2$	Polioxietileno 2 lauril éter
$C_{12}E_4$	Polioxietileno 4 lauril éter
$C_{12}E_5$	Polioxietileno 5 lauril éter
$C_{12}E_6$	Polioxietileno 6 lauril éter
$C_{12}E_8$	Polioxietileno 8 lauril éter
$C_{12}E_{10}$	Polioxietileno 10 lauril éter
$C_{12}E_{23}$	Polioxietileno 23 lauril éter
$C_{14}E_8$	Polioxietileno 8 miristoil éter
$C_{16}E_8$	Polioxietileno 8 palmitoil éter
$C_{18}E_8$	Polioxietileno 8 estearil éter
C	Colato
CHAPS	Cloroamidopropil dimetilamônio propano sulfonato
CMC	Concentração micelar crítica
C^{prot}	Concentração de proteção máxima
C^{sat}	Concentração de saturação (início da hemólise isotônica)
C^{sol}	Concentração de solubilização (100% de hemólise isotônica)
CTAB	Brometo de cetil trimetil amônio
DC	Desoxicolato
D_t^{sat}	Concentração de detergente necessária para início da solubilização
D_t^{sol}	Concentração de detergente necessária para total solubilização
D_w	Solubilidade aquosa do detergente
DTAB	Brometo de dodecil trimetil amônio
EROS	Espécies reativas de oxigênio
GC	Glicocolato
GDC	Glicodesoxicolato
Hb	Hemoglobina
HLB	Balanco hidrofílico lipofílico
Ht	Hematócrito
LC	Litocolato
MM	Massa Molecular
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
OXI-Hb	Oxihemoglobina
PC	Fosfatidilcolina
PBS	Tampão fosfato 5 mM, pH 7,4 com NaCl isotônico (154 mM)
PE	Fosfatidiletanolamina
OS	Fosfatidilserina
R_e	Razão efetiva droga/lipídio na membrana
R^{prot}	Razão droga/lipídio na proteção contra lise hiposmótica
R^{sat}	Razão droga/lipídio na saturação da membrana
R^{sol}	Razão droga/lipídio na total solubilização da membrana
R_e^{sat}	Razão efetiva droga/lipídio na membrana para saturação
R_e^{sol}	Razão efetiva droga/lipídio na membrana para solubilização
RH	Hemólise Relativa (% de Hemólise)
Renex 60	Polioxietileno-nonilfenol n=6
Renex 95	Polioxietileno-nonilfenol n=9,5

Renex 100	Polioxietileno-nonilfenol n=10
Renex 150	Polioxietileno-nonilfenol n =15
Renex 230	Polioxietileno-nonilfenol n=23
RPE	Ressonância paramagnética eletrônica
SDBS	Dodecil benzeno sulfonato de sódio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SM	Esfingomielina
TC	Taurocolato
TDC	Taurodesoxicolato
Triton X100	<i>T</i> -octilfenoxi polietoxi etanol (TTX-100)
Tween 20	Polioxietileno-sorbitol monolaurato
Tween 40	Polioxietileno-sorbitol monopalmitato
Tween 80	Polioxietileno-sorbitol monooleato
UDC	Ursodesoxicolato

RESUMO

Surfatantes ou detergentes são compostos anfifílicos que, na presença de água, têm a característica de formar agregados micelares. Surfatantes induzem a desestruturação de outros agregados como bicamadas sendo, por isso, usados para ruptura celular ou solubilização de lipídios e proteínas de membrana.

A capacidade lítica dos surfatantes resulta de sua estrutura química, que determina o modo de interação dos mesmos com as membranas. Em concentrações mais altas (acima da concentração micelar crítica), os surfatantes desestabilizam as bicamadas lipídicas, levando à formação de micelas-mistas.

Ensaio hemolíticos são bons modelos para estudo do efeito lítico de surfatantes em biomembranas. Aplicando em eritrócitos humanos o tratamento quantitativo proposto por Lichtenberg (1985) para estudo da solubilização de bicamadas lipídicas mensurou-se, neste trabalho, as concentrações para início (C^{sat}) e 100% de hemólise (C^{sol}), induzidas por 25 surfatantes clássicos, pertencentes a cinco diferentes famílias. A variação dos valores de C^{sat} , C^{sol} determinada com diferentes hematócritos permitiu o cálculo da constante de ligação surfatante/membrana e da razão surfatante/lipídio de membrana (Re) para início e 100% de hemólise. O parâmetro **Re** foi usado para classificar os detergentes como fortes, médios ou fracos agentes solubilizantes, com boa correlação com dados da literatura o que nos permitiu propor seu uso para descrever o efeito lítico de surfatantes, como uma alternativa simples e aplicável as membranas biológicas.

As transições durante o processo hemolítico foram acompanhadas pela técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica, com uso marcador de spin 5 doxil-estearato (incorporado a 1 mol% nas membranas de eritrócito) e lise induzida pelo surfatante não iônico Triton X100. Concomitante ao aparecimento de hemoglobina e fosfato livres no sobrenadante - indicadores da ruptura da membrana, medidas do parâmetro de ordem daquele marcador de spin permitiram estudar as transições que acontecem durante (membrana:membrana mista) e após (membrana mista:micela mista) a hemólise.

ABSTRACT

Surfactants or detergents are amphiphilic compounds that form micellar aggregates in the presence of excess water. Surfactants are able to induce disruption of lamellar aggregates, justifying their use for cell lysis or in the extraction of membrane constituents such as lipids and proteins.

The lytic capacity of a given surfactant is determined by its chemical structure, that rules its interaction with the membranes. At high concentration (above the critical micelle concentration), surfactants destabilize lipid bilayer leading to mixed micelle formation.

Hemolytic assays are a good model to study the lytic effect of surfactants on biomembranes. In this study we have applied to human erythrocytes the quantitative treatment proposed by Lichtenberg (1985) to describe the solubilization of model lipid membranes. The concentration for onset (C^{sat}) and complete (C^{sol}) hemolysis induced by 25 classic surfactants from five different families were measured. Changes in C^{sat} and C^{sol} values at different hematocrits allowed the determination of the surfactant/membrane lipid molar ratio (R_e) for beginning and 100% lysis. The R_e parameter was used to classify the surfactants as strong, medium or weak membrane solubilizers. The classification was in good correlation with data in the literature, allowing us to recommend the use of R_e parameter to describe the lytic effect of surfactants on biomembranes.

The transitions in the hemolytic process were accompanied by Electron Paramagnetic Resonance, using the 5-doxyl stearate spin-probe (1 mol%, incorporated in the erythrocyte membrane) and the non-ionic surfactant Triton X100. Simultaneously to the appearance of hemoglobin and phosphate released in the supernatant, measurements of the order parameter of the spin probe were used to characterize the transitions that take place during (membrane:mixed membrane) and after (mixed:membrane:mixed micelle) hemolysis.

1 INTRODUÇÃO

Os organismos vivos estão expostos a um número exorbitante de compostos químicos exógenos (xenobióticos) ou produtos secundários desses, tais como medicamentos, corantes, detergentes, conservantes, flavorizantes da indústria alimentícia, agrotóxicos residuais em frutas e legumes e ainda poluentes industriais que contaminam o ar, a água e o solo. A interação dos xenobióticos com o organismo vivo pode ser tanto benéfica quanto maléfica, a exemplo da atividade terapêutica dos medicamentos ou reações adversas promovidas por esses mesmos agentes ao interagirem com os sistemas biológicos (Berg *et al.*, 2004).

O efeito da maioria dos fármacos sobre o organismo resulta de suas interações com macromoléculas, muitas das quais componentes da membrana plasmática (Benet *et al.*, 1996). A capacidade de um composto químico interagir com membranas biológicas é determinante para sua absorção, distribuição, biotransformação e excreção, bem como para o estabelecimento de sua atividade.

Surfatantes (detergentes ou tensoativos) são compostos anfipáticos, isto é, possuem grupamentos polares e apolares numa mesma molécula. Essa natureza dual confere aos surfatantes a propriedade de adsorção em interfaces ar-água ou óleo-água e é responsável pelos fenômenos de surfactação, micelização e solubilização. Termodinamicamente, os surfatantes agem reduzindo a tensão superficial de uma interface e aumentando sua área de contato, sob pressão e temperatura constantes. Devido a esta propriedade, os surfatantes naturais, como os produtos do metabolismo do colesterol (sais biliares), surfatantes pulmonares, e sintéticos como o dodecil sulfato de sódio (SDS), triton e brometo de cetil trimetil amônio (CTAB), têm sido largamente empregados em pesquisas bioquímicas (Attwood & Florence, 1983).

Na interface química-biologia, existem muitas aplicações para os surfatantes baseadas na sua interação com sistemas biológicos tais como: **a)** solubilização, extração de componentes estruturais das células, como proteínas (Brenner *et al.*, 1995; Minuth *et al.*, 1995; Jones, 1999; Sun *et al.*, 1999; Vasilescu *et al.*, 1999; le Maire *et al.*, 2000; Gohon *et al.*, 2003; Phizicky *et al.*, 2003; Tyers & Mann, 2003;

Seddon *et al.*, 2004) ou hidrofílicos (Huang & Lee, 1994; Chang *et al.*, 1994; Bassetti *et al.*, 1995; Forney & Glatz, 1995; Cummis & Ekeze, 1997), **b**) como agentes de dissolução de drogas e de facilitação da penetração de fármacos através de membranas (Israelachvili, 1985; Yoon & Burgess, 1996; Malcolmson *et al.*, 1998, Uchegbu & Vyas, 1998), **c**) no controle da atividade antimicrobiana (Restaino *et al.*, 1994; Cummis & Ekeze, 1997; Glover *et al.*, 1999). O aumento da permeabilidade da membrana vegetal a herbicidas, da molhabilidade de pesticidas durante a pulverização (Komives *et al.*, 1994; Riechers *et al.*, 1994) e da remoção de metais pesados (Huang & Lee, 1994) são alguns exemplos da aplicação específica desses surfatantes em agricultura.

O uso de surfatantes para controlar a atividade de preparações enzimáticas (Basheer *et al.*, 1995; Kamiya *et al.*, 1995) constitui interessante aplicação em bioquímica. Técnicas rotineiras como eletroforese em gel de policrilamida fazem uso de surfatantes como o SDS (SDS-PAGE) e outros e são largamente utilizadas para a determinação da massa molecular e heterogeneidade de proteínas (Weber & Osborn, 1969; Molloy *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1998; Hiol *et al.*, 1999; Righetti *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2005).

Surfatantes têm encontrado grande aplicação em sistemas para liberação controlada de drogas (Lichtenberg, 2000). Carreadores de fármacos com longo tempo de circulação são interessantes para manter os níveis séricos das drogas, possibilitar o direcionamento específico (para células tumorais, por exemplo) e também para o uso como contraste em exames da integridade vascular (Li *et al.*, 1996). O menor tamanho das micelas de surfatante em relação a outros sistemas de liberação, como lipossomos, retarda seu reconhecimento pelo sistema retículo-endotelial, aumentando seu tempo de circulação (Yokoyama *et al.*, 1991).

Surfatantes biodegradáveis e sensíveis ao pH são bons exemplos do avanço tecnológico nessa área; esses compostos, geralmente aminas lipofílicas com pK entre 5 e 7, têm pouca atividade detergente em pH fisiológico mas, quando endocitadas alcançam os lisossomos, cujo pH ácido promove a formação da forma carregada que é altamente lítica (Torchilin, 1998; Janetzko *et al.*, 1999). Ao romper o

lisossomo, esses surfatantes impedem ou diminuem a degradação precoce de drogas que podem exercer ação intracelular, com DNA (Liang & Hughes, 1998).

Copolímeros de bloco, do tipo A-B (1 cadeia hidrofílica e 1 cadeia hidrofóbica) ou A-B-A- (2:1, com cadeia hidrofóbica dupla) são outros exemplos de micelas especiais com grande tempo de circulação no sangue (Lawrence *et al.*, 1997; Vyas *et al.*, 1997; Torchilin, 1998; Shim *et al.*, 2006). A porção hidrofílica desses compostos é geralmente formada por polietilenoglicol, enquanto a cadeia hidrofóbica pode ser biodegradável contendo cadeias polipeptídicas (Torchilin, 1998; Kwon & Okano, 1999). Chung e col. (1999) descreveram o uso de um copolímero de bloco inteligente, termo-sensível, que induziria o acúmulo específico de drogas anticâncer nas células alvo, modulado por temperatura. Alterando a estrutura química do copolímero. Jayasuriya e col. (1990) conseguiram sintetizar surfatantes não-iônicos com atividade lítica controlável, mostrando que esses surfatantes podem ser interessantes em membranologia.

Talvez o efeito mais estudado de surfatantes seja o de solubilização de membranas biológicas e modelo (Goñi *et al.*, 1986; Moro *et al.*, 1993; Ostolaza *et al.*, 1993; Viguera *et al.*, 1993, 1994; Begona *et al.*, 1994; Requero *et al.*, 1995a,b; Przystalski *et al.*, 1996; Chernitsky & Senkovich, 1997; Ribas, 1997; Galembeck *et al.*, 1998; Liang & Hughes, 1998; Patra *et al.*, 1998; Carafa *et al.*, 1999, Jones, 1999; Togo *et al.*, 1999). Esse efeito depende da ocorrência ou não de ligação entre ambos, surfatante e membrana, do tipo de interação e das modificações que ele induz na mesma. Observa-se que as conseqüências da interação dos surfatantes com a membrana dependem da estrutura do tensoativo como características da porção polar e apolar da molécula, da presença ou não de cargas e da natureza dos substituintes (Helenius & Simons, 1975).

Surfatantes não-iônicos permitem avaliar as interações hidrofóbicas entre seus monômeros ou agregados (micelas) e membranas porque não estabelecem ligações eletrostáticas com os componentes desta (Attwood & Florence, 1983). Em geral, os surfatantes não-iônicos são melhores para quebrar interações entre lipídios e entre lipídios e proteínas, que entre proteínas. Por isso, eles são considerados surfatantes

não-desnaturantes e são amplamente usados no isolamento de proteínas de membranas em suas formas biologicamente ativas (Bhairi, 2001).

Em bioquímica, o uso bastante difundido de surfatantes é na extração de proteínas integrais de membranas, com ou sem a manutenção da estrutura nativa e atividade biológica. Estudos de enzimologia e eletrofisiologia requerem proteínas ativas, enquanto em projetos como os de proteoma, por exemplo, interessa o isolamento e identificação de proteínas expressas, que não precisam ter sua atividade preservada (Phizicky *et al.*, 2003; Tyers & Mann, 2003). O isolamento de proteínas de membrana é mais difícil que o de proteínas globulares (solúveis) e está fortemente baseado no emprego de detergentes de diferentes tipos (Le Maire *et al.*, 2000). Além de poderem ser usados em baixas concentrações, podem apresentar outras características de interesses e vitais (Low *et al.*, 2002). Estudos recentes do genoma estimam que as proteínas transmembranares correspondem a 30% do total de proteínas, com isso é necessário um aumento do desenvolvimento de novas metodologias para solubilização de proteínas de membrana, bem como o enriquecimento da técnica de eletroforese bidimensional, para a análise proteômica (Zhang *et al.*, 2005).

Além disso, alguns surfatantes também têm sido empregados em estudos de solubilização da membrana mitocondrial interna (Nijtmans *et al.*, 2002; Eubel *et al.*, 2004; Sabar *et al.*, 2005).

A membrana mitocondrial interna, por exemplo, é rica em proteínas envolvidas no metabolismo celular, que correspondem a aproximadamente 80% das proteínas totais da membrana (Daum, 1985). Embora a diversidade protéica na membrana mitocondrial interna não seja tão grande comparado a de membranas plasmáticas, como a de eritrócito, bastante estudada em nosso laboratório e cujo número de proteínas é estimado em cerca de 102, revelado por técnicas avançadas de eletroforese 2D (Low *et al.*, 2002), o estudo dessa membrana têm importâncias clínicas diretas, devido às diferentes doenças mitocondriais já descritas, que atingem todo o organismo ao afetarem a produção de ATP pelas células (Wallace, 1999).

Por outro lado, vários compostos com atividade farmacológica são anfipáticos e, como os surfatantes clássicos, tendem a se agregar e interagir com membranas

biológicas. Como consequência, é possível verificar as propriedades de agregação dessas drogas e descrever sua interação com membranas - de forma idêntica a dos surfactantes clássicos, uma vez que elas promovem ruptura e lise das membranas. A compreensão dos efeitos promovidos por esses compostos em biomembranas é fundamental para entendimento de seu mecanismo de ação (Schreier *et al.*, 2000).

Tratando-se de membranas eritrocitárias, objetivo deste trabalho, observa-se uma grande utilidade no estudo da interação de fármacos e cosméticos com sistemas biológicos (Malheiros *et al.*, 2000). Sua facilidade de obtenção (punção intravenosa) e de isolamento (centrifugação), também justificam seu uso como membranas modelo e são especialmente importantes no estudo de mudanças de composição lipídica ou em citoesqueleto (Brito *et al.*, 1996; Rivas *et al.*, 2003), enzimas (Spinedi *et al.*, 1992) ou outras proteínas de membrana. Esse efeito de solubilização depende da ocorrência ou não de ligação entre o surfactante e a membrana, do tipo de interação e das modificações que ele induz na mesma.

1.1 SURFATANTES

Os surfatantes são compostos químicos que apresentam uma natureza dual, possuindo uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica. Em virtude desta anfipaticidade, os surfatantes migram para interfaces, mostrando sua porção hidrofóbica para o ar ou para a fase apolar e a porção hidrofílica para a água, quando colocado em solução, promovendo uma diminuição da tensão superficial da solução em relação a do solvente puro. O alinhamento das moléculas de surfatante nas interfaces reflete a tendência de assumir uma orientação termodinamicamente mais favorável (Attwood & Florence, 1983; Israelachvili, 1985).

A principal característica dos surfatantes é que, quando em solução aquosa diluída (abaixo da cmc), apresentam-se em maior concentração na superfície do que no interior do líquido. Biologicamente, surfatantes iônicos como os sais biliares (ácidos cólico, quenoxicólico, desoxicólico e litocólico) derivados do colesterol são os exemplos bioquímicos mais expressivos da atividade dos surfatantes. Os sais biliares fazem parte da bile e são excretados no duodeno promovendo a emulsificação das gorduras ingeridas, auxiliando na digestão enzimática e na absorção das mesmas (Montgomery, 1994). Esse fenômeno, conhecido como adsorção, ocorre em interfaces líquido/sólido, líquido/líquido e líquido/ar (Porter, 1991). Além dos sais biliares, existem também os surfatantes pulmonares, cuja função é reduzir a tensão superficial alveolar na interface líquido/ar e assim evitar o colapso dos pulmões que impediria a troca gasosa. Os surfatantes pulmonares têm recebido bastante atenção dos pesquisadores, pois sua produção deficiente é uma importante causa de mortalidade em recém nascidos (Jobe, 1993; Braun *et al.*, 1999). A administração, via respiratória, de surfatante pulmonar em recém nascidos portadores da Síndrome da Angústia Respiratória mostrou-se eficaz (Johannsson & Curstedt, 1997).

1.2 CLASSIFICAÇÃO DOS SURFATANTES

Os surfatantes são também conhecidos como tensoativos ou detergentes. Tais compostos são classificados com base na composição da sua porção polar. Em relação à porção hidrofílica, os surfatantes são classificados como: **catiônicos**, **aniônicos**, **não-iônicos** e **zwiteriônicos** (Neugebauer, 1994; Bhairi, 2001).

Catiônicos: são aqueles que em solução aquosa, apresentam carga positiva. São aminas primárias, secundárias ou terciárias, ou sais de amônio quaternário utilizados na indústria têxtil e de fertilizantes, no revestimento de estradas (asfalto), em amaciantes de roupas e condicionadores de cabelo (Ex: CTAB, DTAB).

Aniônicos: Quando dissociados em solução aquosa, apresentam carga negativa. Os principais são compostos carboxilados, sulfatados, sulfonados ou fosfatados. São utilizados em cosméticos, shampoos, desinfetantes, lavanderias industriais, detergentes de uso doméstico, na indústria têxtil e de papel (Ex: SDS, SDBS).

Não-iônicos: Não se dissociam em solução aquosa. São geralmente alquil ou alquil-aril éteres de polióxido de etileno, ou derivados de compostos poli-hidroxicólicos ou oligossacarídeos. São utilizados em shampoos, cosméticos, defensivos agrícolas, no tratamento de metais, nas indústrias têxteis e de petróleo (Ex: Renex, C_x E_y, Tween e Triton).

Zwiteriônicos: Comportam-se como aniônicos ou catiônicos, dependendo do pH do meio em que estão atuando. São N – alquil derivados de aminoácidos, utilizados em produtos de higiene pessoal (sabonete líquido, shampoos, géis), espuma para controle de incêndio, na limpeza industrial e de automóveis. (Ex: betaínas, CHAPS). A porção apolar ou hidrofóbica é geralmente composta por uma cadeia de hidrocarbonetos, podendo também conter moléculas como grupos aromáticos hidrofóbicos (Porter, 1991).

A figura 1 mostra a estrutura química das diferentes séries de surfatantes utilizados.

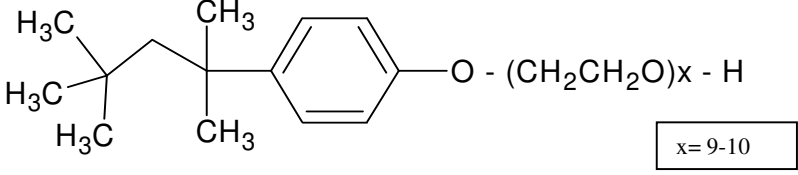
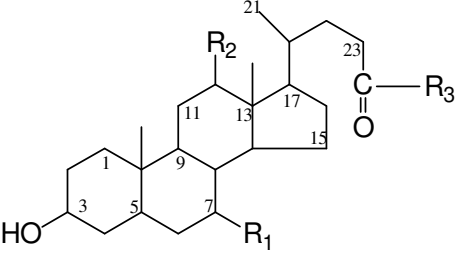
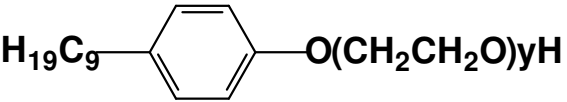
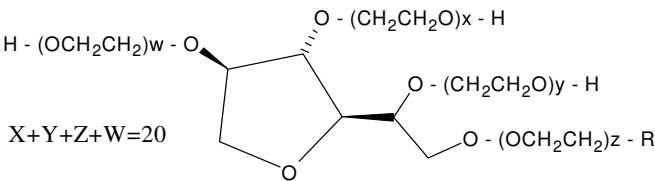
Estrutura	Família																																				
	<i>t</i> -octilfenoxi- polioxi-etileno (Triton) TTX-100																																				
<p>CH₃(CH₂)_xCH₂O(CH₂CH₂O)_yH</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div data-bbox="502 678 783 936" style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>x=10 y=2 C₁₂E₂ x=10 y=4 C₁₂E₄ x=10 y=5 C₁₂E₅ x=10 y=6 C₁₂E₆ x=10 y=8 C₁₂E₈ x=10 y=10 C₁₂E₁₀ x=10 y=23 C₁₂E₂₃</p> </div> <div data-bbox="879 678 1114 936" style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p><u>y = 8 e :</u></p> <p>x= 8 C₁₀E₈ x=10 C₁₂E₈ x=12 C₁₄E₈ x=14 C₁₆E₈ x=16 C₁₈E₈</p> </div> </div>	Éteres de Polioxi-etileno (CxEy)																																				
 <table border="1" data-bbox="707 1014 1153 1335"> <thead> <tr> <th>Abrev.</th> <th>R1</th> <th>R2</th> <th>R3</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>C</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>O⁻</td> </tr> <tr> <td>DC</td> <td>H</td> <td>OH</td> <td>O⁻</td> </tr> <tr> <td>UDC</td> <td>OH</td> <td>H</td> <td>O⁻</td> </tr> <tr> <td>LC</td> <td>H</td> <td>H</td> <td>O⁻</td> </tr> <tr> <td>GC</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>NHCH₂COO⁻</td> </tr> <tr> <td>GDC</td> <td>OH</td> <td>H</td> <td>NHCH₂COO⁻</td> </tr> <tr> <td>TC</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>NHCH₂CH₂SO₃</td> </tr> <tr> <td>TDC</td> <td>OH</td> <td>H</td> <td>NHCH₂CH₂SO₃</td> </tr> </tbody> </table>	Abrev.	R1	R2	R3	C	OH	OH	O ⁻	DC	H	OH	O ⁻	UDC	OH	H	O ⁻	LC	H	H	O ⁻	GC	OH	OH	NHCH ₂ COO ⁻	GDC	OH	H	NHCH ₂ COO ⁻	TC	OH	OH	NHCH ₂ CH ₂ SO ₃	TDC	OH	H	NHCH ₂ CH ₂ SO ₃	Sais Biliares
Abrev.	R1	R2	R3																																		
C	OH	OH	O ⁻																																		
DC	H	OH	O ⁻																																		
UDC	OH	H	O ⁻																																		
LC	H	H	O ⁻																																		
GC	OH	OH	NHCH ₂ COO ⁻																																		
GDC	OH	H	NHCH ₂ COO ⁻																																		
TC	OH	OH	NHCH ₂ CH ₂ SO ₃																																		
TDC	OH	H	NHCH ₂ CH ₂ SO ₃																																		
 <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> <p>y= 6 Renex 60 y= 9,5 Renex 95 y= 10 Renex 100 y=15 Renex 150</p> </div>	Polioxi-etileno- nonilfenóis (Renex)																																				
 <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> <p>R= ác. láurico, C12:0 (Tween 20) R=ác.palmítico,C16:0 (Tween 40) R= ác. oléico, C18:1 (Tween 80)</p> </div>	Polioxi-etileno- sorbitóis (Tween)																																				

Figura 1 – Estruturas químicas dos surfatantes estudados

1.3 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS SURFATANTES

1.3.1 CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA (CMC)

Surfatantes também exibem auto-agregação. Quando em baixa concentração em solução aquosa, eles se encontram como monômeros dispersos. A partir de uma faixa de concentração crítica (específica para cada tipo de surfatante), as moléculas de surfatante agregam-se formando estruturas denominadas micelas (Figura 2). Na figura 2 a porção azul representa a cabeça polar (hidrofílica) e a porção laranja representa a cauda apolar (hidrofóbica) do surfatante. A estreita faixa de concentração na qual se inicia a formação de micelas é denominada de concentração micelar crítica. A agregação em micelas é um evento que ocorre abruptamente e as moléculas de surfatante adicionadas a uma solução que já se encontra na sua CMC são incorporadas nas micelas (Tanford, 1980). No entanto, a idéia de formação de micelas como um processo abrupto é um conceito que não pode ser generalizado, já que vários trabalhos têm descrito a formação de agregados pré-micelares durante o processo de solubilização de alguns surfatantes (Ernandes *et al.*, 1977; Schreier *et al.*, 1978a,b; 2000).

A principal razão que leva os monômeros de surfatantes a se associarem sob a forma de micelas é a diminuição da área de contato entre as cadeias hidrocarbônicas do surfatante e a água. A formação do agregado, porém, leva o surfatante a uma situação onde os grupos hidrofílicos (cabeças) estão muito próximos, gerando uma repulsão eletrostática que se opõe ao processo de micelização.

As micelas (Figura 2) podem apresentar-se na forma de esferas, discos ou cilindros. Em concentrações mais baixas, micelas são esféricas; micelas discóides ou cilíndricas são formadas em concentrações mais elevadas de surfatantes e suas soluções apresentam características líquido-cristalinas ou mesofásicas (Attwood & Florence, 1983). Soluções acima da CMC são compostas de micelas em equilíbrio com os monômeros.



Figura 2 – Representações esquemáticas de micelas

As técnicas mais utilizadas na determinação da CMC envolvem propriedades físicas como tensão superficial, dispersão de luz (Attwood & Florence, 1983), condutividade (Bachofer, 1996; Dominguez *et al.*, 1997) e ressonância paramagnética eletrônica, RPE (Galembeck *et al.*, 1998). O uso de calorimetria de titulação também tem sido um método empregado na determinação da CMC; através desta técnica é possível determinar a partir de um único experimento, além da CMC, a entalpia de micelização (Paula *et al.*, 1995).

Os surfatantes iônicos possuem dois tipos de comportamento em solução aquosa. Abaixo da CMC os monômeros comportam-se como eletrólitos. Após a micelização, cada monômero adicionado contribui para a formação de micelas. A micela não é completamente ionizada, apenas uma fração de íons fica livre na solução. Esta mudança de propriedade da solução é observada em uma titulação condutivimétrica, talvez a metodologia mais empregada para determinação da CMC, pois, já que acima da CMC o aumento na condutividade da solução com a adição de surfatante é menor.

1.3.2 NÚMERO DE AGREGAÇÃO (N)

O número de agregação é a média da composição micelar (em n° de monômeros constituintes) num dado período de tempo, e é estimado pela divisão da massa molecular da micela pela massa molecular do monômero do surfatante (Neugebauer, 1994). Quando se designa um dado número de agregação para um surfatante, pode-se incorrer no erro de imaginar agregados bem definidos e estáticos

em solução, enquanto as micelas são estruturas dinâmicas, já que a troca de monômeros entre elas e a fase aquosa ocorre constantemente (Wennerstron & Lindman, 1979). No entanto, os valores de N indicam o tamanho e a estabilidade dos agregados micelares, podendo chegar a valores muito altos ou a valores de 2-4 como no caso de sais biliares e alguns fármacos (Schreier *et al.*, 2000). O número de agregação pode ser obtido de acordo com a equação abaixo:

$$\text{Número de agregação} = \frac{\text{massa molar micelar}}{\text{massa molar do monômero}} \quad \text{Equação (1)}$$

A massa molecular das micelas pode ser obtida por várias técnicas incluindo filtração a gel, dispersão de luz e dispersão de raios X a baixo ângulo. O número de agregação pode variar de acordo com a natureza do surfatante (Tabela 1). Por exemplo: as micelas formadas por sais biliares tendem a ter número de agregação baixo, enquanto aquelas formadas por Triton X-100 possuem valores altos (Bahiri, 2001).

1.3.3 BALANÇO HIDROFÍLICO-LIPOFÍLICO (HLB)

A anfipaticidade natural dos surfatantes pode ser expressa em termos de balanço entre as porções hidrofóbica e hidrofílica da molécula. A escala empírica de HLB (balanço hidrofílico lipofílico) foi proposta por Griffin (1949) e é usada para determinar o grau de afinidade do tensoativo em relação às fases polar e a apolar, sendo definida como a razão entre fase H/Lx20 (0 a 20), sendo que valores inferiores a nove caracterizam moléculas lipofílicas, e valores acima de onze caracterizam moléculas hidrofílicas.

Em geral, dentro de uma série homóloga, quanto maior o HLB, maior a CMC dos surfatantes. A tabela 1 mostra algumas propriedades físico-químicas dos surfatantes estudados neste projeto.

Tabela I - Propriedades físico-químicas dos surfatantes estudados.

Surfatante	MM ^a	CMC (M) ^a	Nº de Agregação ^a	HLB ^b
C ₁₀ E ₈	511	9,7 x 10 ⁻⁴	-	14,5
C ₁₄ E ₈	567	8,0 x 10 ⁻⁶	-	13,0
C ₁₆ E ₈	595	7,3 x 10 ⁻⁷	-	12,4
C ₁₈ E ₈	623	5,9 x 10 ⁻⁸	-	11,9
C ₁₂ E ₂ ^c	274	-	-	6,5
C ₁₂ E ₄ ^c	363	6,5 x 10 ⁻⁵	40	9,8
C ₁₂ E ₅ ^c	407	6,2 x 10 ⁻⁵	-	10,9
C ₁₂ E ₆ ^c	451	6,7 x 10 ⁻⁵	105	11,8
C ₁₂ E ₈ ^c	539	1,0 x 10 ⁻⁴	120	13,7
C ₁₂ E ₁₀ ^c	630	9,0 x 10 ⁻⁵	-	14,1
Colato	431	6,5 x 10 ⁻³	5	1,6
Desoxicolato	415	2,5 x 10 ⁻³	13	1,6
Litocolato	393	---	2	1,7
Ursodesoxicolato	377	7,0 x 10 ⁻³	-	0,8
Glicocolato	488	7,0 x 10 ⁻³	16	4,4
Glicodesoxicolato	472	1,1 x 10 ⁻³	19	3,8
Taurocolato	538	4,5 x 10 ⁻³	4-5	5,8
Taurodesoxicolato	522	1,5 x 10 ⁻³	22	5,4
Renex 60	484		-	10,9
Renex 95	638	7,8-9,2 x 10 ⁻⁵	-	13,0
Renex 100	660	7,5-9,0 x 10 ⁻⁵	-	13,3
Renex 150	880	1,1-1,3 x 10 ⁻⁴	-	15,0
Renex 230	1232	1,1-1,3 x 10 ⁻⁴	-	16,4
Tween 20	1228	5,9 x 10 ⁻⁵	-	16,7
Tween 40	1288	2,7 x 10 ⁻⁵	-	15,6
Tween 80	1310	1,2 x 10 ⁻⁵	60	15,0
Triton X-100	625	2,5 x 10 ⁻⁴	100-155	13,5

^a de acordo com Bahiri (2001); ^b de acordo com Neugebauer, 1994; ^c de acordo com Berthod et al. (2001); ^d Calculado de acordo com Griffin [1949]

1.4 SURFATANTES E SUAS APLICAÇÕES

1.4.1 SURFATANTES NÃO IÔNICOS DA SÉRIE C_xE_y

Surfatantes da série C_xE_y são polioxietilenos alquil éteres, ou seja, são surfatantes compostos de tipo óxido-etileno adicionados de álcoois lineares. Tais compostos apresentam uma enorme importância econômica e aplicabilidade industrial (Berthod *et al.*, 2001).

Os surfatantes da série C_xE_y têm diferentes aplicações: na extração de proteínas de membrana (Adamo *et. al.*, 2000; Esmann & Skou, 1984; Cho *et. al.*, 2000; Lachaal *et. al.*, 2000), especialmente o $C_{12}E_8$ (le Maire *et. al.* 2000; Victoria & Mahan, 1981), na separação de outros componentes químicos (Berthod *et. al.*, 2001; Clothier & Tomellini, 1996) ou como coadjuvante para liberação controlada de droga (Yamamoto *et. al.*, 1989).

Em 1983, Yotsuyanagi e colaboradores (1983), compararam a solubilização de lipossomas de fosfatilcolina de ovo por $C_{12}E_8$ e pelo sal biliar colato de Na^+ e descreveram que estes lipossomas são lisados, formando micelas mistas de detergente/lipídio. Mostraram também que o $C_{12}E_8$ é bom solubilizante e age tanto na forma de monômero quanto acima de sua CMC, enquanto que o sal biliar só induz a lise em concentrações bem maiores que sua CMC (9 mM). Os artigos que relatam os efeitos dos C_xE_y em membranas de eritrócitos (Isomaa *et. al.*, 1986; Hägerstrand & Isomaa 1991; Ohnishi & Sagitani, 1993; Kellermayer *et. al.*, 1994; Miseta *et. al.*, 1995; Pantaler *et. al.*, 2000), estão relacionados principalmente aos estados pré-líticos, porém sem uma avaliação quantitativa do fenômeno hemolítico.

Esmann & Skou (1984), mostraram boa eficiência de solubilização da bomba de sódio/potássio (Na^+/K^+ ATPase) de glândula retal por $C_{12}E_8$, com aumento da afinidade pelo substrato ATP, verificado pela diminuição na variação de seu K_M .

No presente trabalho utilizou-se inicialmente os surfatantes $C_{10}E_8$, $C_{12}E_8$, $C_{14}E_8$, $C_{16}E_8$, e $C_{18}E_8$, ou seja, homólogos de diferentes constituições da cauda hidrofóbica e cabeça hidrofílica constante. Além de estudarmos a variação da cauda hidrofóbica da série, analisamos a variação da cabeça hidrofílica dos surfatantes e para isso utilizamos os surfatantes $C_{12}E_4$, $C_{12}E_6$, $C_{12}E_8$, e $C_{12}E_{10}$, onde a cauda hidrofóbica de 12 carbonos permanece constante e a constituição da cabeça é variada.

1.4.2 SURFATANTES NÃO IÔNICOS DA SÉRIE RENEX

Muitos detergentes não iônicos derivados do polioxietileno têm importância econômica mundial, dadas as suas propriedades de solubilização, que permitem que sejam usados na fabricação de produtos industriais, na área de farmácia,

cosméticos, química, etc. Polioxietileno nonilfenóis como os detergentes da série Renex são usados como agentes espermicidas em preservativos (Galembeck *et al.*, 1998). Resultados anteriores de nosso laboratório mostraram que Renex de cabeças polares muito longas não são hemolíticos, embora interajam com as membranas, tornando-as mais fluidas (Galembeck *et al.*, 1998). Neste trabalho estudou-se o efeito hemolítico de análogos da série Renex, contendo 6, 10 e 15 unidades de polioxietileno, com eritrócitos humanos.

1.4.3 SURFATANTES NÃO IÔNICOS DA SÉRIE TWEEN

Tween é o nome comercial dado aos surfatantes derivados do polioxietileno-sorbitol, onde o número de grupos polioxietileno é constante (20), variando a composição da cadeia de hidrocarbonetos. Dentro desta série, foram escolhidos três homólogos para estudo: Tween 20, derivado do ácido láurico, Tween 40, derivado do ácido palmítico e o Tween 80, derivado do ácido oléico.

Cadeias hidrofílicas de polioxietileno (POE ou PEG) como as dos Tweens são de baixa toxicidade e, quando em interfaces ou superfícies têm a habilidade de suprimir a adsorção proteica e celular aos componentes do sangue. Além disso, micelas contendo PEG circulam no sangue por mais tempo porque escapam da filtração renal, devido à camada de hidratação conferida pelas cadeias grandes de PEG (Yokoyama *et al.*, 1991; Torchilin, 2005).

1.4.4 SAIS BILIARES

Os sais biliares são detergentes biológicos, sintetizados no fígado (Attwood & Florence, 1983), a partir do colesterol, estocados na vesícula biliar e secretados pelos ductos biliares no duodeno, onde sua principal função é a emulsificação de gorduras. Os sais biliares são compostos alicíclicos, possuindo grupos carboxila e hidroxila.

A Figura 1, mostra a estrutura química dos sais biliares com suas abreviações: colato (C), desoxicolato (DC), ursodesoxicolato (UDC), litocolato (LC), glicocolato (GC), glicoxenodesoxicolato (GDC), taurocolato (TC) e tauroxenodesoxicolato (TDC). Os quatro primeiros compostos são chamados de sais biliares livres, enquanto GC e

GDC (substituídos com uma glicina na cabeça polar) e TC e TDC (substituídos com taurina) são chamados ácidos biliares de primeira e segunda passagem, respectivamente, indicando assim sua metabolização hepática, resultando em compostos menos hidrofóbicos e menos líticos (Baynes *et al.*, 2000).

A perda de uma única hidroxila, na posição 7 ou 12 (comparar a CMC dos pares: DC < C, GDC < GC and TDC < TC) causa redução significativa na CMC dos sais biliares, como mostra a Tabela 1. Já a conjugação dos sais biliares (passagem hepática) não causa variação evidente na CMC dos mesmos, em relação aos sais biliares livres. O pH tem uma influência na formação de micelas desses sais de ácido carboxílico. Os sais biliares que são moderadamente solúveis podem ser precipitados em soluções ácidas, inicialmente, sendo incorporados ou solubilizados em micelas existentes. No entanto, é importante ressaltar que a conjugação hepática faz aumentar significativamente o balanço hidrofílico-lipofílico – HLB - dos compostos (Tabela 1) (Baynes *et al.*, 2000).

A atividade lítica dos sais biliares é altamente dependente de sua estrutura química e de sua hidrofobicidade. A investigação do mecanismo de interação dos sais de colato com membranas celulares é, portanto, de maior importância (Mrówezynska & Bielawski, 2001).

1.5 MEMBRANAS BIOLÓGICAS

A membrana plasmática é a barreira entre o citoplasma da célula e o ambiente externo, controlando a passagem de metabólitos e de solutos em geral de um meio para outro. Em células de mamíferos ela é a única barreira, enquanto células de plantas e bactérias também possuem uma parede celular que mantém a integridade celular, apesar do transporte ainda ser controlado primariamente pela membrana plasmática. Basicamente, as membranas biológicas são constituídas de lipídios, proteínas e carboidratos (que aparecem em menor quantidade e são encontrados na forma de glicoproteínas ou glicolipídios). Os fosfolipídios são os lipídios mais abundantes nas membranas biológicas. Além dos fosfolipídios, os glicolipídios e os esteróis constituem os lipídios da maioria das membranas biológicas. No entanto, a proporção em que esses lipídios encontram-se distribuídos varia para cada espécie,

cada tecido e cada organela de um certo tipo celular, como será discutido a seguir (Nelson & Cox, 2000).

As membranas podem ser descritas pelo modelo do mosaico fluído, proposto por Singer e Nicolson (1972), mostrado esquematicamente na figura 3. Neste modelo, os lipídios da bicamada formam uma mistura uniforme e homogênea. No entanto, muitas evidências têm revelado a existência de domínios lipídicos especializados nas membranas (Ahmed *et al.*, 1997). Os estudos desses domínios têm ajudado a explicar a existência de uma variedade de lipídios nas membranas biológicas já que essa diversidade lipídica seria desnecessária se as membranas atuassem apenas como uma barreira hidrofóbica (Schuck *et al.*, 2003).

Devido à mistura de lipídios e à estrutura da maioria dos fosfolipídios, apresentando cadeias acilas com baixo ponto de fusão nas membranas celulares, estes geralmente encontram-se na fase líquido-cristalino (lc) também chamada de líquido-desordenada (ld), ou seja, as cadeias acilas são fluidas e desordenadas (Brown & London, 1998a,b). Muitos estudos têm sugerido que as membranas plasmáticas de células eucarióticas não estão totalmente no estado ld (Brown & London, 1998a). As membranas podem se encontrar, pelo menos parcialmente, na fase líquido-ordenada (lo). A fase lo é caracterizada por um alto grau de ordem das cadeias acilas e é favorecida por lipídios com ponto de fusão elevado, como os de cadeias acilas saturadas (Brown & London, 1998b). A fase lo apresenta propriedades intermediárias entre o estado gel e fluido. Assim como os lipídios na fase ld, os lipídios na fase lo exibem uma mobilidade lateral relativamente rápida dentro da bicamada (Ahmed *et al.*, 1997).

Nas membranas celulares a fase lo apresenta normalmente uma proporção suficiente de colesterol e esfingolipídios formando microdomínios pela fase ld. Esses microdomínios são denominados “lipid rafts” (Simons & Ikonen, 1997; Brown & London, 1998b; Ikonen, 2001; Schuck *et al.*, 2003). Estudos têm revelado que a 4 °C fragmentos de membrana, insolúveis em detergentes não-iônicos são formados, evidenciando a existência desses microdomínios. Essas porções de membrana resistentes a detergentes chamadas de “DRMs” são ricas em colesterol e

esfingolipídios e podem existir em membranas na fase líquido-ordenada (lo) (Brown & London, 1998a).

DRMs podem ser isoladas de quase todos os tipos de células de mamíferos e provavelmente se originam da membrana plasmática, embora também sejam derivadas de membranas intracelulares (Brown & London, 1998b). Nos últimos anos, diversos estudos têm sido feitos para tentar correlacionar a composição de DRMs com os componentes dos “lipid rafts”, nativos em membranas celulares. Segundo Schuck e col. (2003) diferentes tipos de domínios resistentes a detergentes podem existir, mas a presença de proteínas ou lipídios em DRMs obtidos com um detergente particular não necessariamente indica associação com os mesmos domínios na membrana nativa. Além disso, o isolamento de DRMs com diferentes detergentes não fornece informações sobre a organização espacial das membranas. A associação de proteínas e lipídios em DRMs reflete somente o resultado final do processo de extração (Schuck *et al.*, 2003).

Acredita-se que os “lipid rafts” estejam envolvidos no processo do tráfego intracelular de proteínas e lipídios, destacando-se a atuação em transdução de sinal (Simons & Ikonen, 1997; Brown & London, 1998b; Ikonen, 2001). Apesar de vários trabalhos apontarem características e funções dos “lipid rafts” alguns autores ainda questionam a validade destas colocações visto que o resultado de muitos estudos morfológicos revelou que se os rafts existem, eles são muito difíceis de serem vistos (Rock *et al.*, 1990). De acordo com um trabalho recente de Heerklotz (2002), que descreve a formação de domínios ordenados promovidos por Triton, a identificação de DRMs com “rafts” funcionais ainda é questionável.

Embebidas na membrana estão as proteínas com função de transporte e receptores, necessários ao funcionamento da célula. Essas proteínas são denominadas “intrínsecas”, em oposição às denominadas “extrínsecas”, que se encontram associadas à superfície da membrana (e não atravessam a bicamada). Em membranas plasmáticas, as proteínas extrínsecas associadas a proteínas globulares intracelulares formam uma malha rígida (citoesqueleto) que ajuda a manter a integridade da célula.

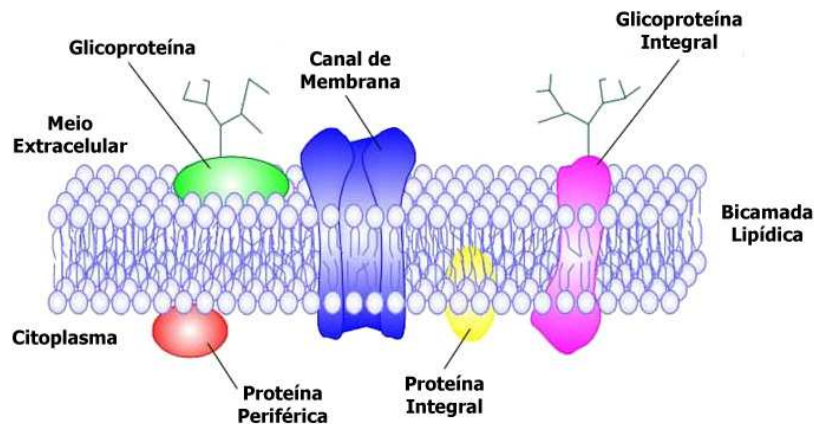


Figura 3 - Representação de uma membrana biológica segundo o Modelo do Mosaico fluido de Singer & Nicolson (1972)

1.5.1 MEMBRANA ERITROCITÁRIA

O eritrócito de mamíferos, célula vermelha do sangue, é uma célula anucleada de forma discóide bicôncava que contém hemoglobina em concentração elevada (cerca de 5 mM/célula, Bull *et al.*, 1990). Muitos autores não consideram os eritrócitos como células verdadeiras, por não possuírem núcleo nem organelas intracelulares. Para estes autores, eritrócitos seriam remanescentes celulares, contendo proteínas e íons específicos que podem estar presentes em altas concentrações. A hemoglobina é a proteína presente em maior quantidade nos eritrócitos, e é sintetizada nas células precursoras dos eritrócitos - eritroblastos e reticulócitos - sob um controle rígido determinado pela concentração do grupo heme, cuja síntese envolve a quelação de íons ferro reduzidos (Fe^{2+}) por quatro átomos de nitrogênio no centro de um anel de porfirina. Os eritrócitos têm como funções importantes o transporte de O_2 e a remoção do CO_2 e do H^+ ; como os eritrócitos não possuem organelas celulares, não são capazes de sintetizar proteínas nem de reparar danos. Como resultado, os eritrócitos possuem uma vida média curta de 60 – 120 dias antes de serem apreendidos e degradados no baço (Baynes *et al.*, 2000). Para cumprir a função de transportar a hemoglobina e levar oxigênio a todas as células, um eritrócito percorre todos os vasos sanguíneos do organismo aproximadamente 500.000 vezes, durante sua vida (Bull *et al.*, 1990) e é capaz de transpor capilares e sinusóides de diâmetros de 3 a 4 μm , que

correspondem a metade de seu próprio diâmetro, de 7 a 9 μm (Scherier, 1985; Bull *et al.*, 1990). Tais fenômenos só são possíveis graças à extrema resistência e deformabilidade da membrana do eritrócito (Lux, 1988). A membrana plasmática do eritrócito também isola o conteúdo celular do meio exterior e ainda regula concentrações intracelulares de cátions e interage com o ambiente via receptores de membrana (Low *et al.*, 2002). Durante sua vida na circulação sofre modificações no conteúdo de lipídios e proteínas de membrana, na fluidez, na atividade enzimática, na permeabilidade iônica e no tamanho (Jain, 1988; Hollan, 1996).

O eritrócito gera ATP através da glicólise para manter suas funções fisiológicas. A concentração intracelular de ATP influencia as propriedades morfológicas e mecânicas dos eritrócitos. Um longo tempo de estocagem ou o esgotamento metabólico causam uma diminuição da microviscosidade da membrana celular. O nível intracelular de ATP influencia o estado tanto dos lipídios como das proteínas da membrana eritrocitária indicando um papel importante do ATP na regulação das propriedades dinâmicas da membrana (Mosior *et al.*, 1990; Murray, 1998). O metabolismo do eritrócito torna-se progressivamente menos ativo e, com o passar do tempo, as células ficam cada vez mais frágeis; quando a membrana da hemácia fica muito frágil, a célula se rompe durante a passagem por capilares sinusoides, de diâmetro inferior ao daquela célula (Berg *et al.*, 2004).

A membrana do eritrócito (Figura 4), devido à sua facilidade de obtenção e isolamento, tem sido extensivamente estudada, e suas características principais são bastante conhecidas, sendo um ótimo modelo para o estudo de membranas mais complexas, e de outros tipos de células (Laurialt & OBrien, 1991). Dessa forma, esta membrana tem sido empregada para estudos de solubilização com surfatantes clássicos ou não (Malheiros *et al.*, 2000; Low *et al.*, 2002). A proporção, em peso, de proteínas:lipídios:carboidratos é de 49:43:8 nessas membranas (Montgomery, 1994).

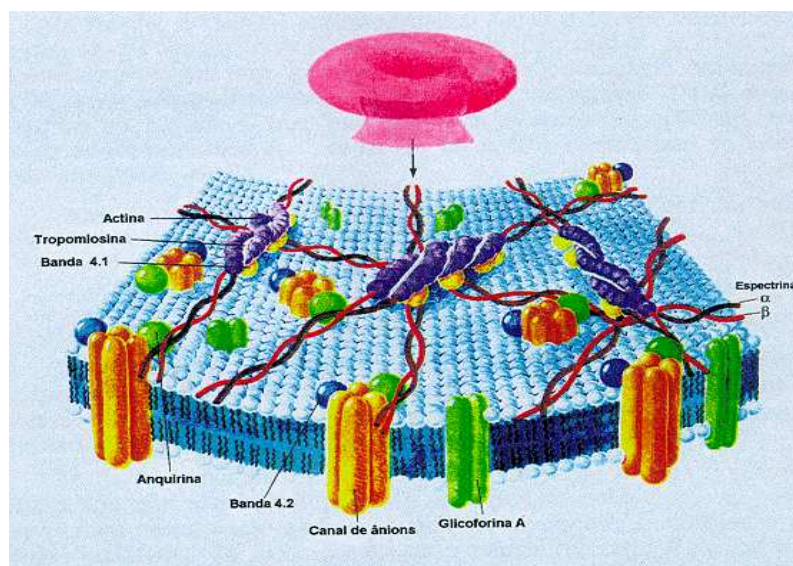


Figura 4 - Representação esquemática da face interna membrana eritrocitária (Voet & Voet, 1990).

A principal classe de lipídios da membrana eritrocitária, bem como na maior parte das membranas biológicas, é a dos fosfolípidios. Segundo Storch & Kleinfeld (1985) a composição lipídica da membrana eritrocitária é: fosfolípidios (47,5%), colesterol (25%), esfingomielina (17,5%) e glicolípidios (10%). Os fosfolípidios estão distribuídos assimetricamente entre as monocamadas interna e externa da membrana eritrocitária. A fosfatidilserina (PS) e a fosfatidiletanolamina (PE) se localizam preferencialmente na monocamada interna (Devaux, 1991; Schroit & Zwall, 1991), enquanto a fosfatidilcolina (PC) e a esfingomielina (SM) encontram-se preferencialmente na monocamada externa (Connor *et al.*, 1990; Devaux, 1991; Schroit & Zwall, 1991).

Os mecanismos responsáveis pela manutenção dessa assimetria são: i) a interação preferencial de fosfolípidios com proteínas da membrana (principalmente com a espectrina), fixando esses compostos na monocamada interna e ii) a existência de translocases (ou flipases) responsáveis pela translocação específica, ATP-dependente, dos fosfolípidios com distribuição assimétrica entre as monocamadas externa e interna (Middelkoop *et al.*, 1988; Devaux, 1991; Wilson *et al.*, 1993).

Os lipídios orientam-se na bicamada expondo sua parte polar ao meio aquoso (Connor *et al.*, 1990) como mostra a figura 4. As proteínas intrínsecas têm uma

porção hidrofóbica que interage com os lipídios, atravessando a bicamada. A maioria das proteínas extrínsecas da membrana eritrocitária está envolvida na formação de um extenso retículo submembranar, que se projeta para o lado citoplasmático da membrana (Figura 4), formando o citoesqueleto eritrocitário. O citoesqueleto eritrocitário é composto por actina, proteína 4,1 (banda 4,1) e espectrina, sendo esta última o seu principal componente. A conexão entre as proteínas intrínsecas e a espectrina do citoesqueleto é feita por uma família de proteínas chamadas anquirinas. A interação da membrana com a espectrina seria responsável pela manutenção da integridade da célula na circulação sanguínea (Platt *et al.*, 1993, 1995). Interações eletrostáticas parecem estar envolvidas na interação da espectrina com a membrana (Kahana *et al.*, 1991), enquanto a existência de regiões hidrofóbicas na molécula sugere que essas também sejam importantes para a manutenção da forma do eritrócito (Streichman *et al.*, 1991).

Além do citoesqueleto, a membrana do eritrócito possui em sua face externa uma outra particularidade: o glicocálix, composto pela glicoforina (proteína intrínseca cuja única cadeia polipeptídica está associada a 16 resíduos de monossacarídios) e outras glicoproteínas e glicolipídios. Essa região, bastante hidrofílica pela característica dos grupamentos OH dos açúcares, tem espessura de 100 nm, isto é 20 vezes maior que o da própria bicamada lipídica (Nelson & Cox, 2000), e constitui uma “barreira adicional” ao eritrócito. É importante considerar essas características da membrana eritrocitária quando se estuda a ação de surfatantes sobre a mesma. Estes surfatantes são capazes de conferir uma proteção contra a lise de eritrócitos e lipossomos (Ribas, 1997; Galembeck *et al.*, 1998;), quando em concentrações baixas (abaixo de sua cmc). Já acima da cmc o dano efetivo de detergentes como os sais biliares, em membranas celulares é um fenômeno bem estabelecido. A membrana do eritrócito é um modelo conveniente para investigação do fenômeno lítico, sendo possível e útil o relato da atividade hemolítica de diferentes detergentes, para avaliar sua citotoxicidade ou vantagens como solubilizantes (Mrówezynska & Bielawski, 2001).

Recentemente, tem sido demonstradas fortes evidências da existência de DRMs em eritrócitos (Salzer & Prohaska, 2001; Rivas & Gennaro, 2003).

Samuel e col. (2001) isolaram proteínas associadas aos “rafts” em seus estudos com eritrócitos depletados de colesterol. O isolamento dessas proteínas foi justificado pela depleção do colesterol, que possibilitaria uma ruptura na estrutura do “raft”. No entanto, resultados de ressonância paramagnética eletrônica (RPE), demonstraram claramente que a matriz lipídica dos “rafts” de eritrócitos ainda permanece, mesmo após uma depleção de 40% do colesterol (Rivas & Gennaro, 2003). Além de demonstrar a existência de DRM em eritrócitos depletados de colesterol, os resultados de RPE apresentados por Rivas & Gennaro (2003) são consistentes com o proposto estado líquido-ordenado dessas estruturas (“lipid rafts”) membranares (London & Brown, 2000). De acordo com Salzer & Prohaska (2001), flotilina-1,2 e estomatina correspondem às principais proteínas integrais dos “lipid rafts” dos eritrócitos. As bandas dessas proteínas foram detectadas apenas em frações de DRM de eritrócitos que não foram depletados de colesterol (Rivas & Gennaro, 2003). O fato dessas proteínas não estarem presentes nas células eritrocitárias depletadas de colesterol reflete a importância do colesterol na estrutura dos “rafts”. No entanto, a depleção de colesterol não deve necessariamente ser a causa da ruptura de “rafts”, pois como demonstrado em eritrócitos, essa depleção pode apenas facilitar a solubilização das proteínas associadas aos “rafts” (Rivas & Gennaro, 2003).

1.5.2 INTERAÇÃO DE SURFATANTES NÃO IÔNICOS COM MEMBRANAS

Edwards & Almgreen (1990) descrevem três fases na interação de surfatantes não-iônicos com lipossomas (Figura 5).

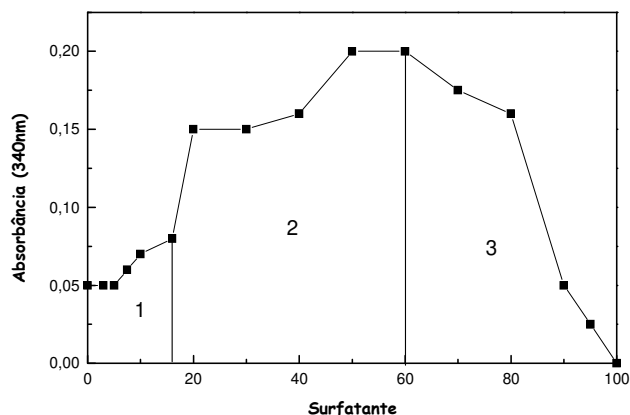


Figura 5 - Perfil de estabilidade de lipossomas convencionais sonicados em função da concentração de surfatante (Santana *et al.*, 1993)

Na primeira etapa, marcada pela baixíssima concentração de surfatantes, o tamanho das vesículas (que pode ser acompanhado pelo aumento na dispersão de luz), permanece aproximadamente igual ao inicial, sugerindo que as moléculas de surfatantes intercaladas não causam grandes modificações nas vesículas. Na segunda etapa, monômeros do surfatante são incorporados na bicamada causando aumento da área total. Na terceira etapa, após uma razão crítica surfatante:lipídio, acontece o rompimento da membrana e a formação de micelas mistas (Edwards & Almgren, 1990). A figura 5 demonstra a medida dessas três etapas na solubilização de lipossomos por C₁₂E₅ (Santana *et al.*, 1993).

Essa descrição revela detalhes da interação molecular dos surfatantes não-iônicos com a bicamada lipídica que acreditamos ser a responsável pelo efeito dessa classe de surfatantes em membranas biológicas. A troca de monômeros (surfatante e fosfolipídios) nas fases 1 a 3 justifica a extração indireta de proteínas membranares (Bangham & Lea, 1978; Pratt & Cook, 1979; Loizaga *et al.*, 1979; Neugebauer, 1994; Molloy *et al.*, 1998), DNA (Cummis & Ekeze, 1997) e também a solubilização da membrana (rompimento).

Conhecer a interação dos surfatantes com membranas biológicas é muito importante para definir possíveis aplicações dessas moléculas nas diversas linhas de pesquisa. Vários autores têm investigado essa interação no que diz respeito à hemólise. Isomaa e col. (1986) estudaram as alterações de permeabilidade induzida

por anfifílicos com diferentes comprimentos da cadeia alquila, em eritrócitos humanos. Trägner & Csordas, (1987) observaram um efeito bifásico (proteção e hemólise) na interação dos surfatantes da série Triton com membranas de eritrócito. Ohnishi & Sagitani (1993) estudaram o efeito da estrutura de surfatantes não-iônicos com cadeia de polióxido de etileno em relação à hemólise e observaram que a atividade hemolítica desses surfatantes diminui com o aumento da cadeia de polióxido de etileno.

A ação de surfatantes clássicos em sistemas biológicos como agentes promotores de lise, extratores de componentes hidrofóbicos (proteínas e lipídios) ou ainda como solubilizadores de membrana tem sido amplamente estudada (Helenius *et al.*, 1975; Lichtenberg, 1985, 2000; Brener *et al.*, 1995; Lasch, 1995; Minuth *et al.*, 1995; Jones, 1999; le Maire *et al.*, 2000; Preté *et al.*, 2002a, b).

Em geral, os surfatantes não-iônicos como polioxietilenos solubilizam proteínas de membrana sem afetar características estruturais importantes. No entanto, alguns surfatantes como octilglicosídeo e C₈E₄ ou C₈E₅ que apresentam a cadeia alquila curta (C7–C10) são mais desnaturantes do que seus correspondentes com uma cadeia alquila intermediária (C12-C14) (le Maire *et al.*, 2000).

O estudo feito por Schuck e col. (2003) demonstrou que DRMs preparadas com uma variedade de detergentes moderados apresentam consideráveis diferenças qualitativas e quantitativas no conteúdo protéico e lipídico, e essas diferenças também dependem do tipo celular. As observações feitas em eritrócitos sugerem que o Triton X-100 é capaz de solubilizar proteínas associadas a DRM quando os eritrócitos são depletados de colesterol (Rivas & Gennaro, 2003).

Bielawski e col. (1995), usando o surfatante não iônico Tween 80 em eritrócitos de rato, demonstraram que o mesmo apresentou comportamento bifásico em relação à lise de eritrócitos.

Galembeck e col. (1998) demonstraram que surfatantes da série Renex, definidos quimicamente como nonilfenóis polietoxilados (surfatante não-iônico) também apresentam comportamento bifásico em relação à lise de eritrócitos, dependendo da concentração e da estrutura das suas cadeias laterais. Entre os surfatantes da série Renex estudados, o Renex 95 apresentou maior efeito

hemolítico em meio isotônico. O Renex 200, não apresentou propriedade hemolítica ou protetora e o Renex 1000 apresentou uma eficiente ação protetora à hemólise provavelmente devido à cadeia de polióxido de etileno (POE) ser muito grande, podendo formar uma capa protetora ao redor do eritrócito. Através da técnica de RPE e utilizando como marcador o ácido 5-doxil esteárico, Galembeck e col. (1998), avaliaram a fluidez de ghosts de eritrócitos pela estimativa do parâmetro de ordem (S) e observaram que os três surfatantes utilizados (Renex 95, 200 e 1000), aumentam a fluidez dessas membranas, mas ressaltam que os marcadores utilizados diferem entre si, quanto a localização preferencial, enquanto que para o Renex 95 os marcadores distribuem-se entre as micelas mistas formadas entre surfatante e fosfolipídios, para os Renex 200 e 1000 os marcadores encontram-se nas micelas formadas apenas pelos surfatantes.

Estudando os surfatantes da série Tween, verificamos que o efeito hemolítico dos Tweens (20, 40 e 80) medidos por liberação de Hb, acontece em razões molares Tween:membrana (7,34:1 , 81,05:1 e 90,49:1, respectivamente) maiores que as observadas com Triton X100 (0,22:1) (Preté *et al.*, 2002). Mesmo considerando o alto HLB dessa série, as razões molares são muito grandes em relação aos valores de literatura para outros surfatantes não-iônicos e ainda que esses surfatantes têm efeito protetor e lítico acima das suas respectivas CMCs (59, 27 e 12 μ M), enquanto que para o Triton X100 este efeito ocorre próximo à sua CMC (0,25 mM). A razão molar surfatante:lipídio na membrana para proteção (R^{prot}) e hemólise (R^{sat} e R^{sol}) revela o perfil da atividade lítica desses surfatantes que segue a ordem a seguir: Triton X100 > Tween 20 > Tween 40 > Tween 80. O efeito protetor dos Tweens tem característica ímpar, pois a proteção estende-se por uma faixa ampla de concentração, ocorre em concentrações superiores a CMC, e é proporcional a hidrofiliabilidade da molécula (Tween 20 > Tween 40 > Tween 80) e ainda concluem que os Tweens são fracos agentes hemolíticos (em relação a outros surfatantes não-iônicos como o Triton X100), o que deve ser justificado pela baixa taxa de troca entre monômeros/lipídios de membrana levando à estabilização da membrana, evidenciada pelos ensaios de proteção à hemólise.

Domigues e col. (2005), utilizando os surfatantes ASB-14 e ASB-16, observaram que os valores de R_e dos análogos ASB-14 e ASB-16 solubilizam membranas biológicas em razões molares surfatante/lipídio menores que o surfatante clássico Triton X-100. Isto significa que estes dois surfatantes apresentam alto potencial de interação com membranas biológicas e podem ser explorados nos processos de solubilização de lipídios e proteínas de membranas, conforme apontado alguns estudos (Chevallet *et al.*, 1998; Molloy *et al.*, 1998; Henningsen *et al.*, 2002). Os valores de K_b determinados confirmam esta alta afinidade ASB/membrana eritrocitária, explicando o alto potencial lítico dos mesmos. Para o ASB-16, que apresentou menores valores de R_e , os valores limites para co-existência de membranas mistas e micelas mistas estão entre 0,08 (R_e^{sat}) e 0,16 (R_e^{sol}) surfatante/lipídio de membrana.

1.5.3 HEMÓLISE ISOTÔNICA

A primeira tentativa de elucidar o fenômeno de hemólise isotônica induzida por xenobióticos data de 1966, quando Seeman classificou os agentes hemolíticos em dois grupos: as hemolisinas específicas e as não específicas. As primeiras induziriam hemólise mesmo em pequenas concentrações ligando-se especificamente à componentes (receptor ou composto específico) da membrana. Seriam exemplos de hemolisinas específicas a digitonina, saponina, holoturina A, entre outras. As hemolisinas não específicas, por sua vez seriam as que protegem eritrócitos contra hemólise hiposmótica em pequenas concentrações, mas que induzem hemólise quando em altas concentrações. Exemplos de hemolisinas não específicas incluem álcoois, vitamina A, lecitinas, ácido esteárico, surfatantes, agentes fenotiazínicos, antiinflamatórios, anestésicos locais entre outros (Seeman, 1972). O método proposto por Seeman para distinguir entre agentes que atuam ou não em componentes específicos de membrana não permite a elucidação de questões importantes sobre o assunto, tais como: o modo de interação entre a droga e a membrana eritrocitária e com quais componentes da membrana a droga interage.

A hemólise ocorre quando há perda da integridade da membrana eritrocitária e proteínas e outras moléculas passam pela membrana. Esse processo pode ser

facilmente monitorado fotometricamente, pela liberação de hemoglobina intracelular. Vários fatores contribuem para a ocorrência de hemólise como temperatura, pH, concentração de eritrócito, concentração de surfatante e concentração e natureza dos íons presentes. A concentração de surfatante necessária para causar um certo grau hemolítico em eritrócitos varia de uma espécie para outra (Gloxhuber, 1980).

Têm-se demonstrado que um número imenso de compostos anfifílicos pode induzir hemólise em condições isosmóticas. Assim, a ação de álcoois (Seeman *et al.*, 1970; Castro *et al.*, 1990; Chi & Wu, 1991), surfatantes (Helenius & Simons, 1975; Isomaa *et al.*, 1986; Trägner *et al.*, 1987; Ohnishi & Sagitani, 1993; Chernitsky & Senkovich, 1997; Galembeck *et al.*, 1998), peptídeos (Ramalingam & Bello, 1992), sais de sílica (Macnab & Harington, 1967), ciclodextrinas (Weisz *et al.*, 1993; Irie & Uekama, 1997), fenotiazínicos (Lieber *et al.*, 1984, Malheiros *et al.*, 1998), lisofosfatidilcolina (Weltzien, 1979), gramicidina (Katsu *et al.*, 1989), antihelmintícos (Malheiros *et al.*, 2000), anestésicos locais (Seeman & Roth, 1972; Malheiros *et al.*, 2000), sobre eritrócitos têm sido objeto de estudo na tentativa de elucidar o mecanismo de indução de hemólise. Em todos esses casos, a intercalação física do composto na bicamada leva à desestabilização e ruptura da membrana.

Sugere-se que a hemólise isotônica induzida por um grande número de compostos ocorreria pela perda da permeabilidade seletiva da membrana. O monitoramento da integridade dos eritrócitos pode ser feito com relativa facilidade, detectando-se fotometricamente a hemoglobina liberada em solução (Laurialt & OBrien, 1991; Malheiros *et al.*, 1998, Malheiros *et al.*, 2000) ou, potenciometricamente, o potássio liberado no meio extracelular, sugerindo que a lise ocorreria em função da formação de pequenos poros na membrana (Chi & Wu, 1991; Harano *et al.*, 1994; Bogner *et al.*, 1996). Este mecanismo é conhecido como coloidosmótico e sugere que os pequenos poros permitem o equilíbrio entre íons, mas a retenção da hemoglobina e seus contra-íons dentro da célula, levaria a um desequilíbrio osmótico, e conseqüente entrada de água, culminando na ruptura total da membrana.

Hägerstrand & Isomaa (1989) descreveram o fenômeno hemolítico que acompanha a partição de moléculas anfipáticas em membranas naturais e artificiais

de modo bastante interessante, considerando que a membrana de eritrócitos pode incorporar uma grande quantidade de anfifílicos sem perder sua integridade e propriedades de barreira. A intercalação de anfifílicos nas membranas seria, no entanto, associada a grandes rearranjos no interior da bicamada lipídica. Assim, ao se intercalar na membrana, os anfifílicos disparariam o aparecimento de uma fase transiente, decorrente de uma redistribuição rápida das moléculas do anfifílico bem como dos lipídios da bicamada. Em concentrações sublétricas altas ocorreria um processo adicional, envolvendo a liberação de vesículas ("budding"). Acredita-se que uma mudança na forma dos eritrócitos para a forma equinocítica ou estomatocítica seja um pré-requisito para ocorrer, respectivamente, uma exo ou endovesiculação. Em concentrações ainda mais elevadas a estrutura da bicamada colapsa e a célula é lisada.

Outro fator determinante na hemólise é a capacidade oxidante que muitos compostos químicos apresentam. Drogas hemolíticas como a aspirina, analina, acetanalida, fenacetina, sulfanilamidas e os agentes antimaláricos primaquina, pamaquina e pentaquina (Cohen & Hochsteins, 1964; Goldberg & Stern, 1976; Koga *et al.*, 1997) são convertidos, *in vivo*, em derivados auto-oxidáveis, o que poderia justificar sua ação hemolítica. Estes compostos favoreceriam reações oxidativas que elevam os níveis celulares do ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio, disparando uma série de processos (oxidação da hemoglobina, peroxidação lipídica e inibição da glicólise) culminando na lise do eritrócito (Golberg & Stern, 1976; Thornalley, 1983; Faivre *et al.*, 1998; Ziopuzenkova *et al.*, 1999).

Lichtenberg (1985) propôs uma metodologia que permite analisar quantitativamente o efeito lítico induzido por surfatantes e outros anfifílicos sobre lipossomas. A metodologia determina a razão efetiva surfatante/lipídio na membrana (R_e) para saturação ou solubilização da membrana lipídica. Além de permitir o cálculo da razão droga/lipídio, a metodologia proposta por Lichtenberg permite o cálculo da constante de ligação (K_b) do surfatante à membrana, e fornece uma estimativa da CMC.

Recentemente, o mesmo autor (Lichtenberg *et al.*, 2000) descreveu o processo de solubilização de membrana induzido por surfatantes como uma

transição bicamada-micela. Dessa forma, fosfolipídios e surfatantes formam agregados mistos em solução aquosa e a estrutura desses agregados pode ser micelar ou lamelar, dependendo da concentração dos dois compostos (fosfolipídio e surfatante). Quando a razão surfatante/lipídio é baixa a estrutura lamelar da membrana é mantida, mas quando esta razão é alta, micelas mistas são formadas (compostas por surfatantes, fosfolipídios e proteínas de membrana) e em razões intermediárias de surfatante/lipídio misturas destes dois tipos de agregados são detectadas (Figura 6). Neste caso, através de ensaios hemolíticos, determina-se D_t^{sat} e D_t^{sol} (concentração de surfatante necessária para início e total solubilização da membrana, respectivamente) em diferentes concentrações de membrana. Destes ensaios determina-se a razão molar efetiva surfatante/lipídio (R_e) para o início (R_e^{sat}) e total solubilização (R_e^{sol}) da membrana pelo coeficiente angular da reta descrito pela equação 2 (Lichtenberg, 1985; 2000; Partearroyo *et al.*, 1992; Requero *et al.*, 1995; Malheiros *et al.*, 1998; 2000):

$$D_t = R_e [L + 1 / \{ K_b (R_e + 1) \}] \quad (2)$$

onde D_t é a concentração total de surfatante (D_t^{sat} , D_t^{sol}) e L é a concentração de lipídio. Os valores de R_e^{sat} e R_e^{sol} representam o limite em termos de razão surfatante/lipídio para a co-existência de membranas mistas e micelas mistas (Lichtenberg *et al.*, 2000).

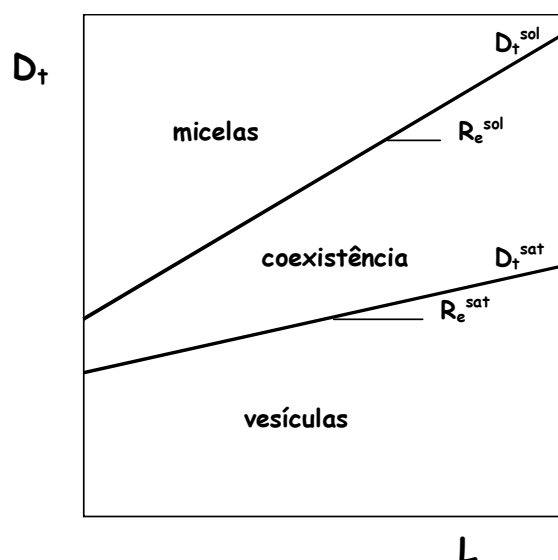


Figura 6 - Esquema de um diagrama de fase de um sistema misto lipídio-surfatante. As linhas representam a concentração de surfatante necessária para o início da solubilização lipídica (D_t^{sat}) e a concentração de surfatante necessária para a completa solubilização (D_t^{sol}) como uma função da concentração de lipídios. Essas linhas são os limites das concentrações de lipídio e surfatante onde vesículas mistas coexistem com micelas mistas.

De acordo com Lichtenberg (1985, 2000), o intercepto nas ordenadas, referente às linhas apresentadas na Figura 6 representa a concentração de detergente livre em água (D_w). Esses dados permitem, ainda, calcular a constante de ligação molar (K_b) dos surfatantes com a membrana.

Em relação ao fenômeno lítico, nosso grupo de pesquisa propôs uma representação dos diferentes equilíbrios que acompanhariam o efeito solubilizador da membrana, incluindo a solubilização aquosa do composto, a ligação à membrana, a formação de membranas mistas até a transição e formação de micelas mistas, representados na Figura 7 (Schreier *et al.*, 2000).

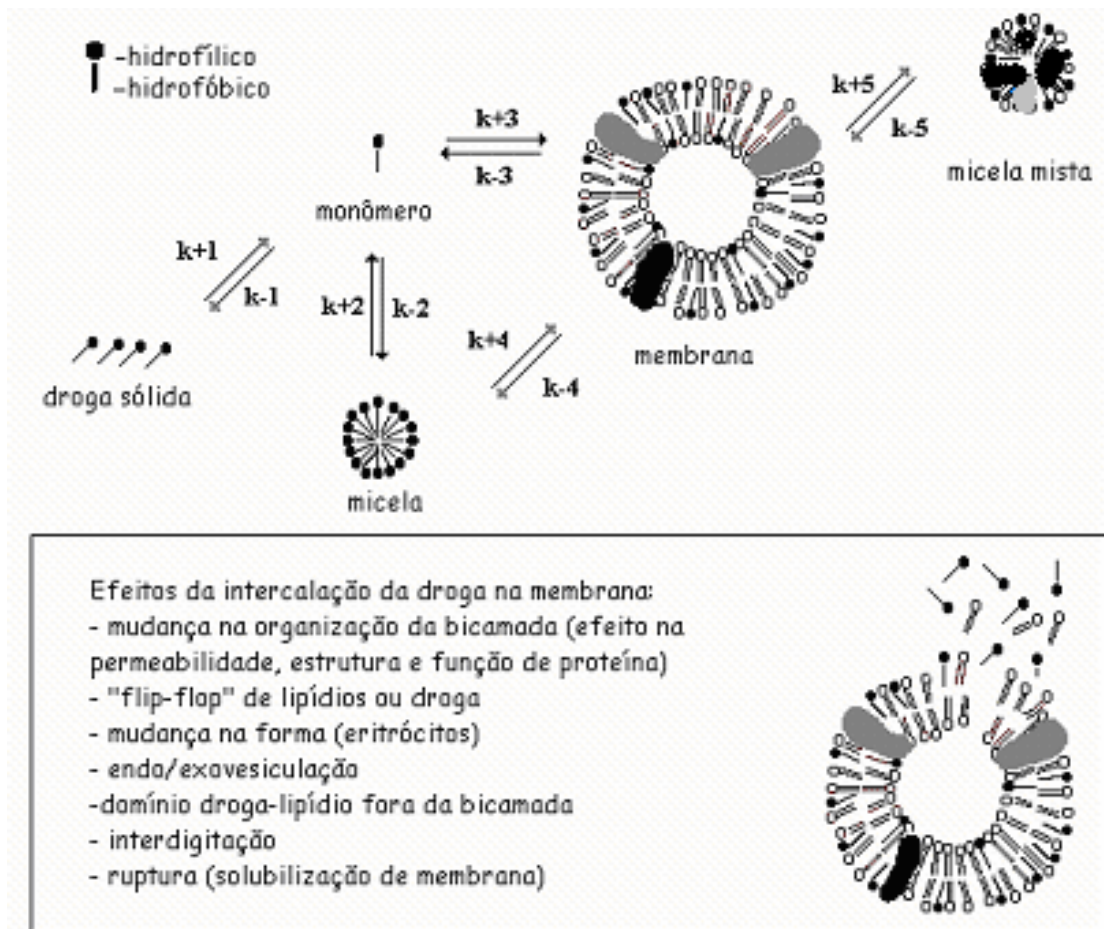


Figura 7 – Adaptação do esquema dos possíveis eventos envolvidos na interação de surfatante com membrana biológica, iniciando do estado sólido. Os processos correspondem à: 1- solubilização do anfifílico; 2- equilíbrios entre monômero-agregado; 3- ligação do monômero à membrana; 4- equilíbrios do anfifílico entre micela-membrana. Após a saturação da membrana, moléculas do surfatante saem da membrana carregando componentes da membrana (lipídios e proteínas). As constantes representam cada processo. Os prováveis eventos resultantes da interação surfatante-membrana estão listados no esquema (Schreier et al., 2000).

No presente trabalho investigou-se a interação de surfatantes clássicos com a membrana eritrocitária: 1) através da análise quantitativa de hemólise e 2) pelas perturbações da membrana, medidas por EPR (Ressonância Paramagnética Eletrônica), comparando esses dados para facilitar o entendimento do mecanismo de lise e a melhor aplicação dos detergentes clássicos.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

- Estudar a interação dos surfatantes, com membranas de eritrócitos, visando esclarecer a natureza dessa interação e os mecanismos envolvidos na hemólise, utilizando 5 diferentes famílias: Série polioxietileno alquil éter, homólogos de diferentes constituições da cauda hidrofóbica e cabeça hidrofílica, Sais biliares, Polioxietileno-nonilfenóis (Renex), Polioxietileno-sorbitóis (Tween) e *t*-octilfenoloxypolietoxietileno (TTX-100);
- Comparar os resultados do efeito hemolítico quanto à variação da cauda hidrofóbica e da cabeça hidrofílica dos surfatantes bem como as demais propriedades;
- Comparar os resultados obtidos com o surfatante não-iônico TTX-100 e demais. Essa comparação será avaliada quanto a razão efetiva surfatante:lipídio, para a solubilização dos eritrócitos, de acordo com o tratamento clássico de Lichtenberg (1985) para agentes tensoativos;
- Estudar através do EPR (variação do grau de organização dessas membranas), procurando esclarecer as transições envolvidas no processo hemolítico;
- Estudar o mecanismo de hemólise causado por surfatantes.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Os surfactantes das séries: polioxietileno alquil éter- C_xE_y ($C_{10}E_8$, $C_{12}E_2$, $C_{12}E_4$, $C_{12}E_5$, $C_{12}E_6$, $C_{12}E_8$, $C_{12}E_{10}$, $C_{12}E_{23}$, $C_{14}E_8$, $C_{16}E_8$, e $C_{18}E_8$), *t*-octilfenoloxypolietoxietileno-TTX-100, Polioxietileno-sorbitóis-Tween (20, 40 e 80) e os sais biliares (Desoxicolato, Litocolato, Ursodesoxicolato, Glicocolato, Glicodesoxicolato, Taurocolato, Taurodesoxicolato), foram obtidos da Sigma Chemical Co. Os detergentes da série Polioxietileno-nonilfenóis-Renex (60, 95, 100, 150 e 230), foram gentilmente doados pela indústria Oxiteno do Brasil, São Paulo/SP.

O sangue humano foi cedido pelo Hemocentro da Unicamp. As bolsas de sangue eram recentes (até 3 dias da data de coleta) e possuíam sorologia negativa para Chagas, sífilis, AIDS e hepatite B. É importante ressaltar que somente após a aprovação deste projeto de pesquisa pela diretoria da Unidade (Hemocentro) as bolsas de sangue foram fornecidas para a pesquisa. (Parecer projeto 397/2003)

3.2 Métodos

3.2.1 Caracterização Óptica dos Surfactantes

A partir de estoques mantidos ao abrigo da luz, as soluções de surfactantes foram preparadas no mesmo dia de uso e solubilizadas nos devidos tampões de trabalho, de acordo com o objetivo do experimento.

Nesta caracterização foram feitas varreduras do espectro de absorção no UV-visível (200-700 nm) de soluções conhecidas de todos os surfatantes (citados no item 3.1) em espectrofotômetro Beckman modelo DU70. As soluções foram preparadas em condições de pH e osmolaridade fisiológica (pH 7,4 e 154 mM NaCl).

Todas as medidas foram feitas na temperatura ambiente (22-25°C)

3.2.2 Testes de Autoxidação dos Surfactantes

Testamos a oxidação dos surfactantes através da determinação da presença de peróxido nos estoques de surfactantes puros usando teste colorimétrico com iodeto de potássio (Merck Standarts, 1972).

Em resumo: preparou-se uma solução 10% m/v de KI e adicionou-se uma alíquota (100 µl) do surfactante, na proporção 1:11 (KI : surfactante). As soluções de surfactantes foram preparadas, a partir de estoques mantidos no escuro e temperatura ambiente. As soluções obtidas foram agitadas e mantidas no escuro por 1 hora. A presença de peróxido foi determinada pelo aparecimento de coloração amarelada na solução, devido à oxidação do iodeto a iodo molecular (absorbância determinada em espectrofotômetro a 353 nm).

3.2.3 Preparo da Suspensão de Eritrócitos

O sangue humano com anticoagulante (27 mM citrato sódico, 72 mM cloreto sódico, 114 mM glicose e 2.6 mM ácido cítrico) foi centrifugado por 5 min. a 700 xg. O plasma, células brancas e gorduras removidos por aspiração. As células vermelhas foram ressuspensas em tampão fosfato, PBS 5 mM (NaH_2PO_4 2mM, Na_2HPO_4 3 mM e NaCl 154 mM), pH 7,4, tampão de osmolaridade e pH fisiológico, sendo novamente centrifugadas nas mesmas condições. Após três repetições consecutivas desse processo obtêm-se um concentrado de hemáceas que é mantido sob refrigeração (4 °C). Esta “papa” de hemáceas, com concentração de 100% (Ht100%) foi diluída para hematócritos diferentes com o mesmo tampão, de acordo com o objetivo do experimento (0,075%, 0,15%, 0,225%, 0,3% ou 40%).

3.2.4 Teste Hemolíticos em meio isotônico

A determinação da resistência à hemólise foi acompanhada pela incubação das suspensões de eritrócitos em solução isotônica (PBS) com diferentes concentrações dos surfatantes citados no item (3.1). Após incubação de 15 min. a 37°C as amostras foram centrifugadas por 5 min. a 1500 xg e a concentração de hemoglobina no sobrenadante determinada espectrofotometricamente a 540 nm. Nesse comprimento de onda o coeficiente de extinção molar da oxi-Hb é de 55.200

(Riggs, 1981). Foram realizadas medidas em triplicatas para cada concentração de surfatante e também para os seguintes controles: c_1 = eritrócitos em PBS (controle de hemólise mecânica) e c_2 = eritrócitos em água destilada (controle de hemólise total). É importante ressaltar que os experimentos foram realizados com bolsas de sangue diferentes também.

O efeito hemolítico (% de Hemólise) foi acompanhado medindo-se a concentração de hemoglobina ou fosfato inorgânico no sobrenadante, de acordo com a equação 3:

$$\% \text{ Hemólise} = \frac{A_a - A_{c1}}{A_{c2} - A_{c1}} \times 100 \quad (3)$$

onde A_a , A_{c1} e A_{c2} são respectivamente as absorvâncias da amostra, dos controles c_1 e c_2 em 540 nm. Estes experimentos foram realizados com diferentes hematócritos (0,075%, 0,15%, 0,225%, 0,3% e 40%), tal que, pelo tratamento de Lichtenberg (1985) seja possível determinar as concentrações para início (C^{sat}) e hemólise total (C^{sol}).

3.2.5 Tratamento de Lichtenberg

Lichtenberg (1985) descreveu uma metodologia em que os parâmetros tirados diretamente das curvas hemolíticas, isto é, a concentração para saturação e solubilização da membrana levam a determinação de Re^{sat} e Re^{sol} , a razão molar efetiva surfatante/lipídio para saturação e solubilização, respectivamente da membrana do eritrócito.

A equação 4 mostra o tratamento proposto por Lichtenberg para o cálculo de D_w .

$$D_t = R_e [L + 1 / \{ K_b (R_e + 1) \}] \quad (4)$$

Plotando-se a concentração de surfatante (D_t) para o início (C^{sat}) ou 100% de hemólise (C^{sol}) versus a concentração lipídica da membrana (L), obtêm-se retas cujo intercepto no eixo das ordenadas corresponde a concentração máxima de surfatante

em água, D_w , que é indicativa da CMC do surfatante. A inclinação da reta fornece o valor de R_e . (Lichtenberg, 1985; Partearroyo *et al.*, 1992; Malheiros *et al.*, 1998).

3.2.6 Estudos de EPR

A técnica de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) é uma técnica espectroscópica que opera na região de microondas (GHz) e detecta transições de estados de spin eletrônicos. A técnica detecta compostos com um ou mais elétrons desemparelhados (moléculas paramagnéticas); os spins eletrônicos, quando submetidas a um campo magnético, orientam-se segundo seus momentos magnéticos de spin. Quando se aplica uma onda eletromagnética ressonante com a precessão do spin eletrônico, ocorre absorção de energia e transição do estado de spin. A técnica pode ser discutida como na equação 5:

$$h \cdot \nu = g \cdot \beta \cdot H \quad (5)$$

onde: h = constante de Planck; ν = frequência da radiação incidente; g = representa o fator g do elétron; β = magneton de Bohr ; H = campo magnético externo.

A absorção é registrada no espectro de EPR como a primeira derivada das bandas de absorção de energia da amostra (Schreier *et al.*, 1978; Warren, 1987).

As moléculas paramagnéticas não são tão frequentes em sistemas biológicos. Para o estudo de sistemas diamagnéticos, a técnica do marcador de spin veio solucionar esse problema (Hubbel & McConnell, 1971; Warren, 1987). Através do uso de um marcador paramagnético estável, é possível obter informações de caráter estrutural e da mobilidade (tempo de correlação rotacional) do sistema no qual a sonda está inserida. Em particular nas membranas a técnica do marcador de spin trouxe enorme contribuição (Hubbel & McConnell, 1971).

Os marcadores de spin mais utilizados são aqueles contendo radical nítróxido, por ser estável em amplas faixas de temperatura e pH. Esta molécula, ao se intercalar na membrana, tende a se orientar preferencialmente. Os marcadores do

tipo ácido doxil esteárico orientam-se com o eixo z aproximadamente paralelo ao eixo normal da bicamada (Warren, 1987).

A partir de espectros de EPR, é possível calcular o parâmetro de ordem (S, eq. 6) que é uma medida da anisotropia do ambiente em que se encontram as moléculas do marcador de spin. O espectro desses marcadores apresenta parâmetros que refletem as orientações nos eixos x, y (extremos internos) e z (extremos externos) que são usados para a determinação de S (Figura 8). O parâmetro de ordem é uma medida da orientação da molécula em relação ao eixo diretor (normal à bicamada) e varia de 0, em sistemas isotrópicos, até 1, para uma molécula perfeitamente orientada (Jost *et al.*, 1971). S reflete a amplitude angular do movimento anisotrópico da molécula e pode ser obtido experimentalmente por:

$$S = \frac{A_{//} - A_{\perp}}{A_{zz} - [(A_{xx} + A_{yy}) / 2]} \quad (6)$$

onde: $A_{//}$ e A_{\perp} são medidos diretamente no espectro de EPR. A_{zz} , A_{xx} e A_{yy} são os principais componentes do tensor hiperfino, medidos em monocristal, e tem os valores típicos constantes de 32, 6 e 6 G, respectivamente (Schreier *et al.*, 1978).

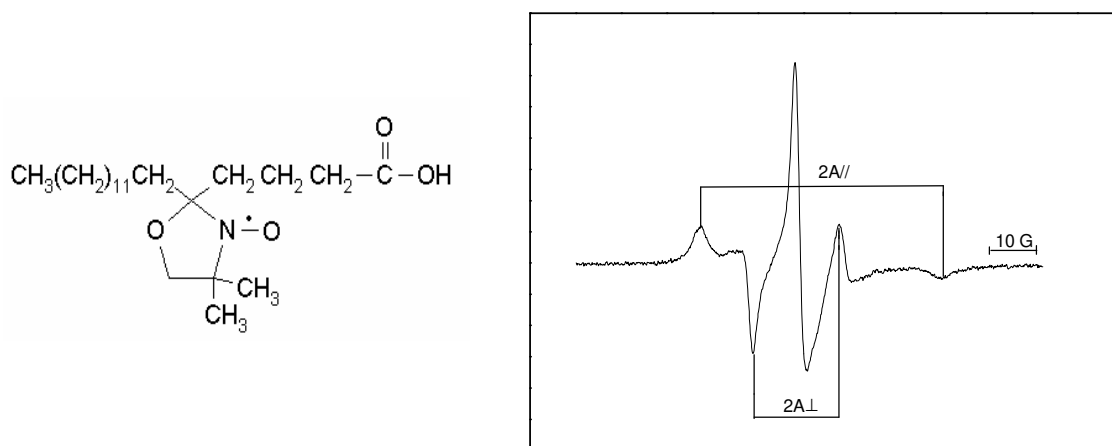


Figura 8 - Estrutura química do marcador 5-SASL e Espectro de RPE do marcador em membrana eritrocitária.

As medidas foram conduzidas no espectrômetro Varian E-4 ou no espectrômetro Bruker ER-200, ambos operando em frequência de 9 GHz (3,4 kGauss), pertencente ao laboratório da Dra. Shirley Schreier (IQ/USP). Celas chatas de quartzo, para amostras líquidas, com capacidade para 0,1 e 0,2 ml foram utilizadas e todos os experimentos realizados a 22°C.

Medidas do efeito dos detergentes sobre o grau de organização da membrana foram realizadas com os marcadores 5 doxil estearato (5-DSA-2mol%) incubados com suspensões de eritrócitos (Ht-40%) em solução isotônica (PBS) com concentrações crescentes de TTX-100. Após incubação de 15 min. a 37°C as amostras foram centrifugadas por 5 min. a 1500 xg. Foram realizadas também medidas somente do surfatante TTX-100 com 5 DSA.

O grau de organização foi analisado pela alteração dos parâmetros de ordem (S) e empírico $h+1/h_0$ (de Paula & Schreier, 1995). Foram analisadas amostras antes da centrifugação (sangue total), sobrenadante e pellet (ambas após a centrifugação).

4 RESULTADOS

O corpo dos resultados obtidos compõe o material de 2 artigos publicados, 1 submetido a revistas de política editorial seletiva e ainda outros resultados:

4.1 Quantitative assessment of human erythrocyte membrane solubilization by Triton X-100.

4.2 Solubilization of human erythrocyte membranes by non-ionic surfactants of the polyoxyethylene alkyl ethers series.

4.3 Multiple stages of detergent-erythrocyte membrane interaction – A spin label study.

4.4 Testes Hemolíticos em Condições Isotônicas com surfatantes não iônicos da série C₁₂E_y , série Renex, série Tween e Sais biliares.

4.1 QUANTITATIVE ASSESSMENT OF HUMAN ERYTHROCYTE MEMBRANE SOLUBILIZATION BY TRITON X-100

Letter

Quantitative assessment of human erythrocyte membrane solubilization by Triton X-100

P.S.C. Preté, S.V.P. Malheiros, N.C. Meirelles, E. de Paula*

Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), C.P. 6109, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil

Received 21 November 2001; received in revised form 11 February 2002; accepted 11 February 2002

Abstract

We report here a quantitative analysis of the interaction of the non-ionic surfactant Triton X-100 with human erythrocyte membranes. By applying a classical treatment for the interpretation of the action of surface active compounds to the hemolytic curves, we could calculate parameters such as R_e —the effective surfactant/lipid molar ratio for erythrocyte membrane saturation (R_e^{sat}) and total lysis (R_e^{sol})—and K_b , the binding constant of Triton X-100 to human erythrocyte membranes. The K_b (5900 M^{-1}) and R_e (1.58 and 2.14) values presented here are in good agreement with literature data for Triton X-100 solubilization of model phospholipid membranes. © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Erythrocyte; Triton X-100; Membrane; Surfactants; Hemolysis; Solubilization

Triton X-100 is the non-ionic surfactant most frequently used in biochemistry, with a wide range of applications to biological systems [1–3]. Solubilization of lipid membranes triggered by Triton X-100 is a well-described phenomenon [4–7] and its hemolytic action has also been studied [8–12], although without an appropriate quantitative approach. The high solubilizing capacity of Triton X-100 is related to its hydrophobic character, as can be evaluated from its *HLB* (13.5) [13] and *cmc* ($2.5 \times 10^{-4} \text{ M}$) [14] values. For instance, the lytic potency of Triton X-100 is higher [15] than

that of non-ionic detergents belonging to the Renex [16], Tween [17] or C_nE_m series [18], with *HLB* values between 14 and 19.

It is interesting to note that although a large number of studies devoted to the interpretation of the hemolytic phenomena occurring with the use of Triton X-100 as the solubilizing agent have been published [8,9,19–22], none of them presented a straight-forward quantitative analysis of the phenomenon. Only Loizaga et al. [11] reported that a Triton X-100/protein (4.7:1 w/v) was necessary to induce 50% hemolysis of human erythrocytes.

The major objective of the present study was to quantitatively analyze the interaction of Triton X-

*Corresponding author. Tel.: +55-19-3788-6143; fax: +55-19-3788-6129.

E-mail address: depaula@unicamp.br (E. de Paula).

100 with erythrocyte membranes using the approach described by Lichtenberg [23,24].

Fig. 1a presents the hemolytic curves obtained with increasing concentrations of Triton X-100 in erythrocyte suspensions of $Ht=0.075\%$ under isotonic conditions in PBS buffer, pH 7.4. Arrows indicate the surfactant concentration for the onset of solubilization (C^{sat}) and for 100% (C^{sol}) solubilization. The erythrocyte suspension was prepared from fresh human blood and the hemolytic activity was measured by hemoglobin release into the supernatant, as described by Malheiros et al. [25].

The analysis of membrane solubilization proposed by Lichtenberg [23] was applied, considering C^{sat} and C^{sol} as the surfactant concentration required to induce saturation (the onset of hemolysis) and total membrane solubilization (total lysis), respectively [25].

C^{sat} - and C^{sol} -values for different erythrocyte concentrations (0.075, 0.15, 0.30 and 0.45%; Table 1) were plotted as a function of the lipid concentration in these hematocrits [26] in Fig. 1b. The straight line obtained is predicted by Eq. (1) [4,27]:

$$D_t = R_e [L + 1/K_b(R_e + 1)] \quad (1)$$

where D_t is the total surfactant concentration (C^{sat} , C^{sol}) and L is the lipid concentration in the system. The slope of the resulting straight lines allows R_e calculation and the y -intercept corresponds to the concentration of free detergent in water, D_w [23,28]. Finally, K_b (M^{-1}), the molar binding constant of the surfactant to the erythrocyte membrane, could easily be derived, according to Eq. (2) [23,28]:

$$R_e^{\text{sat}} = K_b \cdot D_w / (1 - K_b \cdot D_w) \quad (2)$$

The R_e values obtained seem quite reasonable, considering the physicochemical properties of Triton X-100 (Table 2); the values of 1.58 and 2.15 for the onset of solubilization and for complete solubilization, respectively, are comparable to those obtained by other authors for the solubilization of liposomes.

In 1974, Dennis [29] reported that egg phosphatidylcholine bilayers were able to incorporate Triton X-100 up to a detergent/lipid molar ratio of 1:1; the author also reported that at ratios above 2:1, all the lipids were solubilized in mixed micelles. In a further study, Partearroyo et al. [4] described the solubilization of the same phosphatidylcholine vesicles in terms of the effective detergent/lipid molar ratios in the membrane, and obtained R_e^{sat} - and R_e^{sol} -values of 0.7:1 and 3:1, respectively [4].

The hemolytic process induced by surface-active compounds can be described as a bilayer-to-micelle transition depending on the surfactant/lipid ratio; in intermediate ratios these two types of aggregates are detected. R_e^{sat} and R_e^{sol} determine the limits, in terms of detergent/lipid ratios, for the co-existence of mixed-membranes and mixed-micelles [24].

The concentration of free detergent in water, D_w^{sat} and D_w^{sol} , obtained by the y -axis intercepts of the straight lines in Fig. 1b were smaller (104 and 188 μM) than that pointed by the cmc -value, determined by surface-tension measurements (240 μM) [8,19,30,31]. These findings agree with the observations of Lichtenberg et al. [24] that consider D_w values as the cmc values in the presence of membranes, since the bilayer would facilitate the micelle formation.

The binding constant ($5900 M^{-1}$) determined here is higher than that estimated by Partearroyo et al. ($1900 M^{-1}$) for the binding of Triton X-100 to egg phosphatidylcholine unilamellar vesicles [4], or by Pantaler et al. ($1570 M^{-1}$) for Triton X-100/human erythrocyte binding [32]. In fact, Triton X-100 binding to erythrocyte membranes is

Table 1
Hemolytic effect of Triton X-100 on human erythrocyte membranes

Ht (%), L (μM)	C^{sat} (μM)	C^{sol} (μM)
0.075, 6.5	117	192
0.15, 13	131	222
0.30, 26	169	213
0.45, 39	184	255

L =lipid concentration in erythrocyte membranes corresponding to each hematocrit, calculated according to [26].

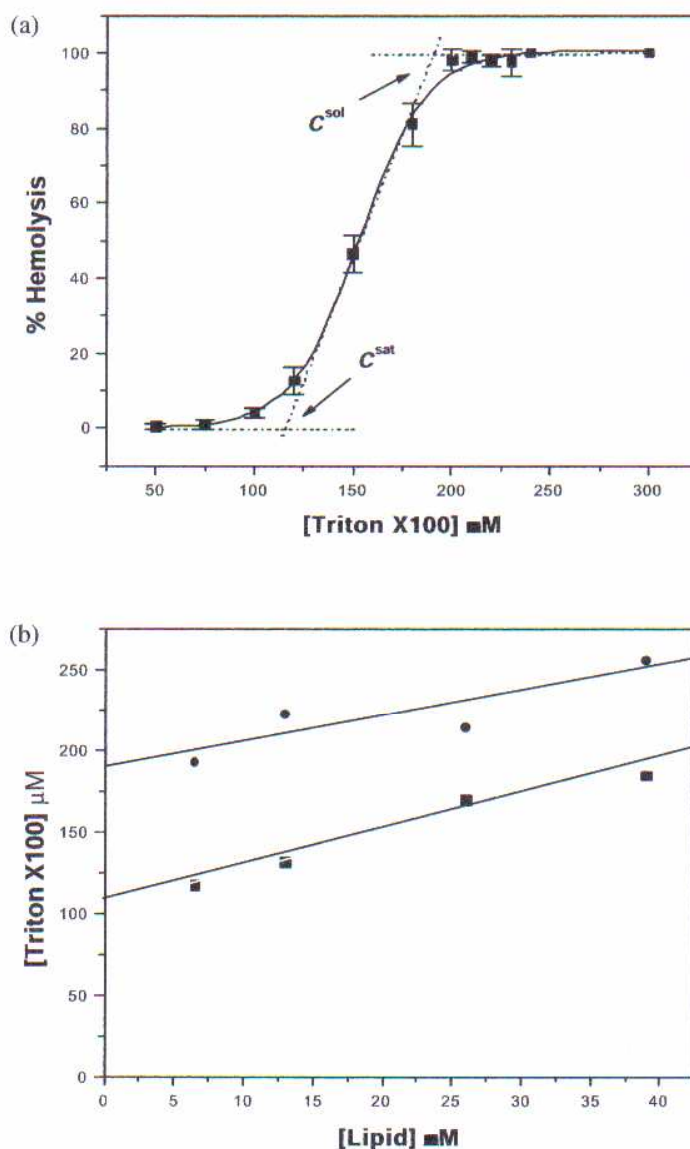


Fig. 1. Hemolytic effect of Triton X-100 on human erythrocytes. (a) $Ht=0.075\%$. (b) C^{sat} (■) and C^{sol} (●) were plotted as a function of erythrocyte lipid concentration—data from Table 1 for $Ht=0.075, 0.15, 0.30$ and 0.45% —and R_e values were calculated from the slope of the straight lines. 5 mM PBS buffer, pH 7.4, after 15 min incubation at 37 °C.

stronger than that observed for many non-ionic and ionic surfactants [33], explaining its hemolytic capacity.

The quantitative description of the lytic effect is of practical importance in the comparison of the solubilizing capacity of a large number of amphi-

philes that interact with membranes [15]. The relationship between the aggregative and solubilizing properties of amphiphiles has been well characterized [3,8,19,23] and in recent studies, we have demonstrated that Lichtenberg's treatment could be useful to describe the hemolytic effect of

Table 2
Effective surfactant/lipid molar ratios and related parameters in the hemolysis of erythrocytes by Triton X-100; experimental condition as in Fig. 1

	Triton X-100
R_c^{sat}	1.58
R_s^{sol}	2.15
D_w^{sat} (μM)	104.1
D_w^{sol} (μM)	188.0
K_b ($\times 10^3 \text{ M}^{-1}$) ^a	5.9

^a Taken from the saturation curves in Fig. 1.

both non-classical [25] and classical surfactants [18].

Acknowledgments

Grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Proc. 01/03632-0) are gratefully acknowledged.

References

- [1] J.V. Moller, M. le Maire, J.P. Andersen, in: A. Watts, J.J.H.M. de Pont (Eds.), *Progr. Protein-Lipid Interact.*, vol. 2, Elsevier, Amsterdam, 1986, p. 147.
- [2] W.L. Hinze, E. Pramauro, A critical review of surfactant-mediated phase separations (cloud point extractions): theory and applications, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 24 (1993) 133–177.
- [3] M.N. Jones, Surfactants in membrane solubilisation, *Int. J. Pharm.* 177 (1999) 137–159.
- [4] M.A. Partearroyo, M.A. Urbaneja, F.M. Goñi, Effective detergent/lipid ratios in the solubilization of phosphatidylcholine vesicles by Triton X-100, *FEBS Lett.* 302 (1992) 138–140.
- [5] J. Ruiz, F.M. Goñi, A. Alonso, Surfactant-induced release of liposomal contents. A survey of methods and results, *Biochim. Biophys. Acta* 937 (1988) 127–134.
- [6] J. Lasch, J. Hoffmann, W.G. Omelyanenko, et al., Interaction of triton X-100 and octyl glucoside with liposomal membranes at sublytic and lytic concentrations. Spectroscopic studies, *Biochim. Biophys. Acta* 1022 (1990) 171–180.
- [7] K. Edwards, M. Almgren, Kinetics of surfactant-induced leakage and growth of unilamellar vesicles, *Progr. Coll. Polym. Sci.* 82 (1990) 190–197.
- [8] D. Trägner, A. Csordas, Biphasic interaction of triton detergents with the erythrocyte membrane, *Biochem. J.* 244 (1987) 605–609.
- [9] J. Bielawski, Two types of haemolytic activity of detergents, *Biochim. Biophys. Acta* 1035 (1990) 214–217.
- [10] F.H. Kirkpatrick, S.E. Gordesky, G.V. Marinetti, Differential solubilization of proteins, phospholipids, and cholesterol of erythrocyte membranes by detergents, *Biochim. Biophys. Acta* 345 (1974) 154–161.
- [11] B. Loizaga, I.G. Gurtubay, J.M. Macarulla, F.M. Goñi, J.C. Gómez, Membrane solubilization by detergents, and detergent/protein ratios, *Biochem. Soc. Trans.* 7 (1979) 148–150.
- [12] K. Araki, J.M. Rifkind, The rate of osmotic hemolysis: a relationship with membrane bilayer fluidity, *Biochim. Biophys. Acta* 645 (1981) 81–90.
- [13] J. Neugebauer, *A Guide to the Properties and Uses of Detergents in Biology and Biochemistry*, Calbiochem-Novabiochem Int, La Jolla, 1994.
- [14] W.C. Griffin, *J. Soc. Cosmet. Chem.* 1 (1949) 311–326.
- [15] S. Schreier, S.V.P. Malheiros, E. de Paula, Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects, *Biochim. Biophys. Acta* 1508 (2000) 210–234.
- [16] E. Galembeck, A. Alonso, N.C. Meirelles, Effects of polyoxyethylene chain length on erythrocyte hemolysis induced by poly[oxyethylene (n) nonylphenol] non-ionic surfactants, *Chem.-Biol. Interact.* 113 (1998) 91–103.
- [17] J. Bielawski, L. Mrówczyńska, M. Konarczak, Hemolytic activity of the non-ionic detergents Tween 80 and Triton X-100, *Biol. Bull. Poznan* 32 (1995) 27–41.
- [18] P.S.C. Preté, K. Gomes, S.V.P. Malheiros, N.C. Meirelles, E. de Paula, Solubilization of human erythrocyte membranes by nonionic surfactants of the polyoxyethylene alkyl ethers series. *Biophys. Chem.* (2002) in press.
- [19] A. Helenius, K. Simons, Solubilization of membranes by detergents, *Biochim. Biophys. Acta* 415 (1975) 29–79.
- [20] B.Y. Zaslavsky, N.N. Ossipov, V.S. Krivich, L.P. Baholdina, S.V. Rogozhin, Action of surface-active substances on biological membranes, *Biochim. Biophys. Acta* 507 (1978) 1–7.
- [21] K. Svoboda, C.F. Schmidt, D. Branton, S.M. Block, Conformation and elasticity of the isolated red blood cell membrane skeleton, *Biophys. J.* 63 (1992) 784–793.
- [22] M. Ohnishi, H. Sagitani, The effect of nonionic surfactant structure on hemolysis, *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 70 (1993) 679–684.
- [23] D. Lichtenberg, Characterization of the solubilization of lipid bilayers by surfactants, *Biochim. Biophys. Acta* 821 (1985) 470–478.
- [24] D. Lichtenberg, E. Opatowski, M.M. Koslov, Phase boundaries in mixtures of membrane-forming amphiphiles and micelle-forming amphiphiles, *Biochim. Biophys. Acta* 1508 (2000) 1–19.
- [25] S.V.P. Malheiros, E. de Paula, N.C. Meirelles, Contribution of trifluoperazine/lipid ratio and drug ionization

- to hemolysis, *Biochim. Biophys. Acta* 1373 (1998) 332–340.
- [26] S.V.P. Malheiros, N.C. Meirelles, E. de Paula, Pathways involved in trifluoperazine, dibucaine and praziquantel induced hemolysis, *Biophys. Chem.* 83 (2000) 89–100.
- [27] M.A. Requero, F.M. Goñi, A. Alonso, The membrane-perturbing properties of palmitoyl-coenzyme A and palmitoylcarnitine. A comparative study, *Biochemistry* 34 (1995) 10400–10405.
- [28] D. Lichtenberg, in: M. Shinitzki (Ed.), *Biomembranes. Physical Aspects*, Weinheim, 1993, pp. 63–95.
- [29] E.A. Dennis, Formation and characterization of mixed micelles of the nonionic surfactant Triton X-100 with egg, dipalmitoyl, and dimyristoyl phosphatidylcholines, *Arch. Biochim. Biophys.* 165 (1974) 764–773.
- [30] J. Vanede, J.R.J. Nijmeijer, S. Wellingwester, C. Orvell, G.W. Welling, Comparison of non-ionic detergents for extraction and ion-exchange high-performance liquid-chromatography of sendai virus integral membrane-proteins, *J. Chromatogr.* 476 (1989) 319–327.
- [31] L.M. Kushner, W.D. Hubbard, Viscometric and turbidimetric measurements on dilute aqueous solutions of a non-ionic detergent, *J. Phys. Chem.* 58 (1954) 1163–1167.
- [32] E. Pantaler, D. Kamp, C.W.M. Haest, Acceleration of phospholipid flip-flop in the erythrocyte membrane by detergents differing in polar head group and alkyl chain length, *Biochim. Biophys. Acta* 1509 (2000) 397–408.
- [33] H. Hågerstrand, B. Isomaa, Amphiphile-induced anti-haemolysis is not causally related to shape changes and vesiculation, *Chem-Biol. Interact.* 79 (1991) 335–347.

**4.2 SOLUBILIZATION OF HUMAN ERYTHROCYTE MEMBRANES
BY NON-IONIC SURFACTANTS OF THE POLYOXYETHYLENE
ALKYL ETHERS SERIES**



ELSEVIER

Biophysical Chemistry 97 (2002) 45–54

Biophysical
Chemistry

www.elsevier.com/locate/bpc

Solubilization of human erythrocyte membranes by non-ionic surfactants of the polyoxyethylene alkyl ethers series

P.S.C. Preté, K. Gomes, S.V.P. Malheiros, N.C. Meirelles, E. de Paula*

Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), C.P. 6109, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil

Received 8 November 2001; received in revised form 11 February 2002; accepted 11 February 2002

Abstract

In the present study, we investigated the interaction of the non-ionic surfactants polyoxyethylene alkyl ethers (C_nE_m) with erythrocyte membranes. For this purpose we have performed hemolytic assays under isosmotic conditions with five surfactants in the 8 polyoxyethylene ether series. By applying to the hemolytic curves a quantitative treatment developed for the study of surface-active compounds on biomembranes, we could calculate the surfactant/lipid molar ratios for the onset of hemolysis (R_e^{sat}) and for complete hemolysis (R_e^{sol}). This approach also allowed the calculation of the binding constants for each surfactant to the erythrocyte membrane. Results in the C_nE_m series were compared to those obtained for Triton X-100, a well-known non-ionic surfactant with values of *cmc* and HLB in the range of the alkyl ethers studied. Inside the series the lytic effect increased with the more hydrophobic homologues ($C_{10}E_8 < C_{12}E_8 < C_{14}E_8 < C_{16}E_8 < C_{18}E_8$), with *Re* values between 3:1 and 0.03:1. The effect of $C_{10}E_8$ and $C_{12}E_8$ was found to be in the range of that caused by Triton X-100, proving that C_nE_m surfactants are strongly hemolytic. © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Erythrocyte; Membrane; Surfactants; Hemolysis; Solubilization

1. Introduction

Most non-ionic surfactants are ethylene oxide derivatives and they have an enormous economic

importance worldwide since their detergency, wetting and foaming properties allow their use in industrial and household products [1]. Other applications of non-ionic surfactants include the extraction of membrane proteins [2–6] or preparation of drug-delivery formulations [7,8].

Non-ionic surfactants are also used in membrane studies, since they can induce solubilization of the bilayer [5,9–11] leading to mixed-micelle formation. In 1985, Lichtenberg proposed a treatment to evaluate the solubilizing effect of surface-active

Abbreviations: *cmc*, critical micelle concentration; C_nE_m , polyoxyethylene alkyl ether; HLB, hydrophilic–lipophilic balance; Ht, hematocrit; PBS, phosphate buffered saline; M_w , molecular weight; Triton X-100, *t*-octylphenoxypoly ethoxyethylene.

*Corresponding author. Tel.: +55-19-3788-6143; fax: +55-19-3788-6129.

E-mail address: depaula@unicamp.br (E. de Paula).

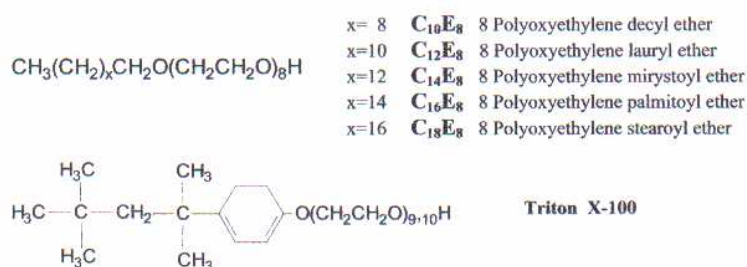


Fig. 1. Chemical structure of the non-ionic surfactants studied.

compounds on biomembranes [12] allowing the determination of the effective surfactant/lipid molar ratio in the membrane for the lytic effect. Although many studies in the literature have reported the lytic effect of detergents such as Triton X-100 [13–15], Tween [16–18], Texofor [19] and Renex [11], only the group of Goñi [10,20–22] applied this treatment to the study of solubilization of lipid and biological membranes by non-ionic surfactants.

The present investigation is a quantitative study of the interaction of non-ionic 8 polyoxyethylene alkyl ether surfactants (C_nE_8) with erythrocyte membranes using Lichtenberg's treatment [12]. The solubilizing properties of five homologous compounds in this series (Fig. 1) are presented and compared to those of Triton X-100, the best studied non-ionic surfactant so far, whose MW, *cmc* and HLB are in the range of those for the surfactants studied.

2. Materials and methods

The surfactants (C_{10}E_8 , C_{12}E_8 , C_{14}E_8 , C_{16}E_8 , C_{18}E_8 and Triton X-100) were obtained from the Sigma Chemical Co.

2.1. Erythrocytes

Freshly obtained human blood was collected into a stock solution containing 26.3 g/l trisodic citrate, 3.27 g/l citric acid, 31.9 g/l dextrose, 2.2 g/l sodium phosphate and 0.275 g/l adenine, and washed three times in 5 mM PBS buffer, pH 7.4.

2.2. Hemolytic assay

The surfactants were added to erythrocyte suspensions (0.075–0.45% hematocrit, diluted in PBS), and the samples were kept for 15 min at 37 °C. After centrifugation at $260\times g$ for 3 min, the released hemoglobin concentration in the supernatant was measured at 412 nm. The hemolytic effect, expressed as percentage hemolysis (%), was determined as described by Malheiros et al. [23]. Triplicate test tubes and at least two different blood samples were used for each curve.

2.3. R_e (surfactant/lipid ratio) calculation

The analysis of membrane solubilization proposed by Lichtenberg [12] was applied, considering C^{sat} and C^{sol} as the surfactant concentration required to induce saturation (the onset of hemolysis) and total membrane solubilization (total lysis), respectively [23,24]. These concentrations were determined from the hemolytic curves, and plots of C^{sat} and C^{sol} as a function of membrane lipid concentration allowed the determination of R_e , the effective surfactant/lipid molar ratio for initial (saturation, R_e^{sat}) and total hemolysis (solubilization, R_e^{sol}), according to Eq. (1) [10,25]:

$$D_t = R_e[L + 1/K_b(R_e + 1)] \quad (1)$$

where D_t is the total surfactant concentration (C^{sat} , C^{sol}) and L is the lipid concentration in the system. The slope of the resulting straight lines allows R_e calculation while the y intercept corresponds to D_w , the concentration of free detergent in water, [12,26]. Finally, K_b (M^{-1}), the molar binding constant of the surfactants to the erythro-

cyte membrane, could easily be derived from Eq. (2) [12,26]:

$$R_e = K_b \cdot D_w / (1 - K_b \cdot D_w) \quad (2)$$

As in previous publications [10,23,24] K_b was calculated just from the value of R_e^{sat} , since at 100% solubilization (R_e^{sol}) no more membrane, but mixed-micelles are present [51], which may give rise to different K_b values.

3. Results and discussion

Non-ionic polyoxyethylene alkyl ethers are ethylene oxide adducts of linear alcohols (Fig. 1) that have been used with different approaches such as membrane protein extraction [27–31], phase-separation of chemical compounds [1,32], or as a co-adjuvant in drug-delivery systems [7,8,33].

While lipid membrane solubilization triggered by Triton X-100 is a fairly well described phenomenon [10,20,34,35] and its hemolytic action has been studied [13,14,36–38], the interaction of polyoxyethylene alkyl ethers with lipid membranes [39,40] has not been investigated to any great extent. Even papers devoted to the study of the effect of C_nE_m on erythrocyte membranes [41–47] were mainly related to the pre-lytic stage or did not present a quantitative approach to the hemolytic phenomena.

Hemolysis is the disruption of the red blood cell and can be caused by the interaction of chemical compounds with the membrane. The effect of amphiphilic compounds on the stability of erythrocyte membranes tends to be biphasic; at small drug/lipid molar ratios they protect erythrocytes against hypotonic lysis, whereas at higher molar ratios in the membrane they induce hemolysis [24,48–50].

Fig. 2 presents the hemolytic curves obtained with increasing concentrations of $C_{10}E_8$ and $C_{18}E_8$ in erythrocyte suspensions ($Ht=0.075, 0.15, 0.30$ and 0.45%) under isotonic conditions and at pH 7.4. Arrows indicate the surfactant concentration for the onset (C^{sat}) and 100% (C^{sol}) solubilization on the curve of $Ht=0.075\%$.

Table 1 lists C^{sat} and C^{sol} values obtained from hemolytic curves as those illustrated in Fig. 2 for all the detergents studied. The values of C^{sat} and

C^{sol} for Triton X-100 lay between those for $C_{10}E_8$ and $C_{12}E_8$ solubilization. Inside the polyoxyethylene alkyl ethers, C^{sat} and C^{sol} decreased with increases in the hydrophobic portion of the surfactant, which reflects the importance of the hydrophobic interaction in the hemolytic process. Increased erythrocyte membrane binding with detergents of longer hydrophobic tails has been described before—at hyposmotic condition—for C_nE_m , anionic, cationic and zwitterionic series [43]. It is interesting to note that in contrast to the criticism of other authors relative to hemolytic and anti-hemolytic studies [16,17,19,45], our results show that inside the C_nE_m series, HLB (Table 2) is a good parameter to evaluate the ability of a detergent to bind to the membrane and to be a good lytic agent; the lower the HLB, the smaller the C_nE_m concentration for membrane solubilization (C^{sat} and C^{sol}).

Solubilization involves hydrophobic interactions between the surfactant chains and the lipid or proteins of the membrane. According to Helenius and Simons [9], membrane solubilization by surfactants is dependent on aggregation. In general, it is accepted that the amount of surfactant required to solubilize the membrane increases with the *cmc* of the surfactant [5,13]. In fact, the relationship between the aggregative and solubilization properties of amphiphiles has been very well characterized [12], and reviewed by us in a recent paper [50]. We have also demonstrated that Lichtenberg's treatment could be useful to describe the hemolytic effect of non-classical surfactants such as the phenothiazine trifluoperazine [23,24].

Table 2 presents some physicochemical properties of the surfactants studied. The *cmc* and *HLB* values of Triton X-100 show its amphiphilic character comparable to those of $C_{10}E_8$ and $C_{12}E_8$. It is interesting to note that the HLB of the C_nE_8 compounds studied vary between 11.9 and 14.5—approximately equal to the value of Triton X-100, a good lytic detergent [50]—while the less lytic non-ionic surfactants Renex [11] and Tween [18] show higher HLB values, from 14 to 19.

C^{sat} and C^{sol} were plotted as a function of lipid concentration in Fig. 3, to give the straight lines predicted by Eq. (1). The corresponding surfactant/lipid molar ratios in the membrane, R_e , were

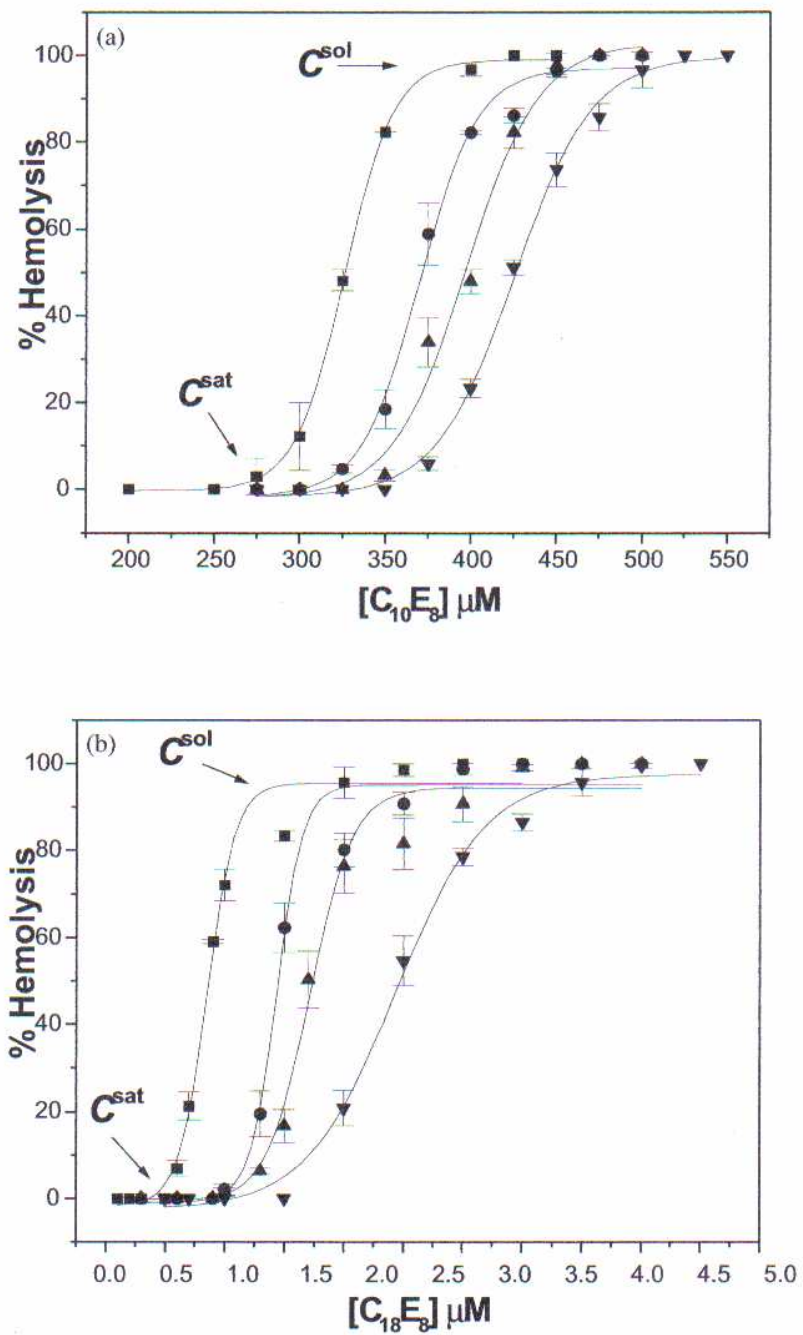


Fig. 2. Hemolytic effect of $C_{10}E_8$ (a) and $C_{18}E_8$ (b) upon human erythrocytes in 5 mM PBS buffer, pH 7.4, 37 °C. Ht=0.075 (■), 0.15 (●), 0.30 (▲) and 0.45% (▼). The arrows show C^{sat} and C^{sol} (see text) determination in the 0.075% curve.

Table 1
Hemolytic effect of polyoxyethylene alkyl ethers, C_nE_8 surfactants and Triton X-100 upon human erythrocyte membranes

Surfactants <i>Ht</i> (%) <i>L</i> (μ M)	C^{sat} (μ M)				C^{sol} (μ M)			
	0.075	0.15	0.30	0.45	0.075	0.15	0.30	0.45
	6.5	13	26	39	6.5	13	26	39
$C_{10}E_8$	295	335	352	375	354	406	441	475
$C_{12}E_8$	30.2	32.1	35.1	38.8	37.0	37.3	40.3	43.5
$C_{14}E_8$	5.9	6.1	7.4	10.2	6.6	6.8	8.5	12.5
$C_{16}E_8$	1.9	2.2	2.9	6.8	2.8	2.8	5.2	8.2
$C_{18}E_8$	0.6	1.2	1.3	1.6	1.1	1.7	2.1	3.2
Triton X-100	117	131	169	184	192	222	213	255

L = lipid concentration in erythrocyte membranes corresponding to each hematocrit, calculated according to Malheiros et al. [24].

readily calculated from the saturation and solubilization lines in Fig. 3 and are listed in Table 3, as well as K_b . The values of D_w were calculated from the intercept of the straight lines in Fig. 3.

In the hemolytic tests some surfactants seems to be more affected by the micellization process, making it difficult to precisely determine the values of (and differences between) C^{sat} and C^{sol} . That would be the case of the more lytic $C_{16}E_8$ and $C_{18}E_8$, with the smallest *cmc* values; the energy involved in the transfer of monomers of surfactant and membrane lipids to the mixed-micelles are easily overcome, and C^{sat} and C^{sol} values verge upon each other, explaining the deviation from linearity in the straight lines predicted by Eq. (1) (Fig. 3b).

In a recent review, Lichtenberg et al. [51] mention that the D_w values reported in the literature are always smaller than the measured values of *cmc* ($D_w^{sat} < D_w^{sol} < cmc$), since the lipids offer an additional driving force for micelle formation, decreasing the *cmc* (in the presence of the

membrane). In that way, the values of D_w presented in Table 3 are in very good agreement with literature data on Table 2.

The hemolytic process induced by surface-active compounds can be described as a bilayer-to-micelle transition. At low surfactant/lipid ratios, the lamellar structure of the erythrocyte membrane is maintained; at quite high ratios, mixed-micelles (composed by the surfactant, phospholipids and membrane-bound proteins) are formed and at intermediate ratios of surfactant/lipid, mixtures of these two types of aggregates are detected. R_e^{sat} and R_e^{sol} represent the limits, in terms of the detergent/lipid ratios, for the co-existence of mixed-membranes and mixed-micelles [51].

The R_e values obtained seem quite reasonable, considering the physicochemical properties of Triton X-100; the values of 1.58 and 2.15 for the onset of solubilization and for complete solubilization, respectively, are comparable to those obtained by other authors in the solubilization of liposomes. In 1974, Dennis [52] described that

Table 2
Physicochemical properties of the non-ionic surfactants: C_nE_8 ; and Triton X-100

Name	Abbrev.	MW	HLB ^a	<i>cmc</i> (M) ^b
8 Polyoxyethylene decyl ether	$C_{10}E_8$	510.7	14.47	9.7×10^{-4}
8 Polyoxyethylene lauryl ether	$C_{12}E_8$	538.8	13.71	8.8×10^{-5}
8 Polyoxyethylene miristoyl ether	$C_{14}E_8$	566.8	13.04	8.0×10^{-6}
8 Polyoxyethylene palmitoyl ether	$C_{16}E_8$	594.9	12.42	7.3×10^{-7}
8 Polyoxyethylene stearyl ether	$C_{18}E_8$	622.9	11.86	5.9×10^{-8}
Octylphenoxy polyoxyethylene	Triton X-100	625.0	13.50	2.5×10^{-4}

^a Calculated according to Griffin [62].

^b Data from Berthod et al. [1] for the C_nE_8 series, and Neugebauer [2] for Triton X-100.

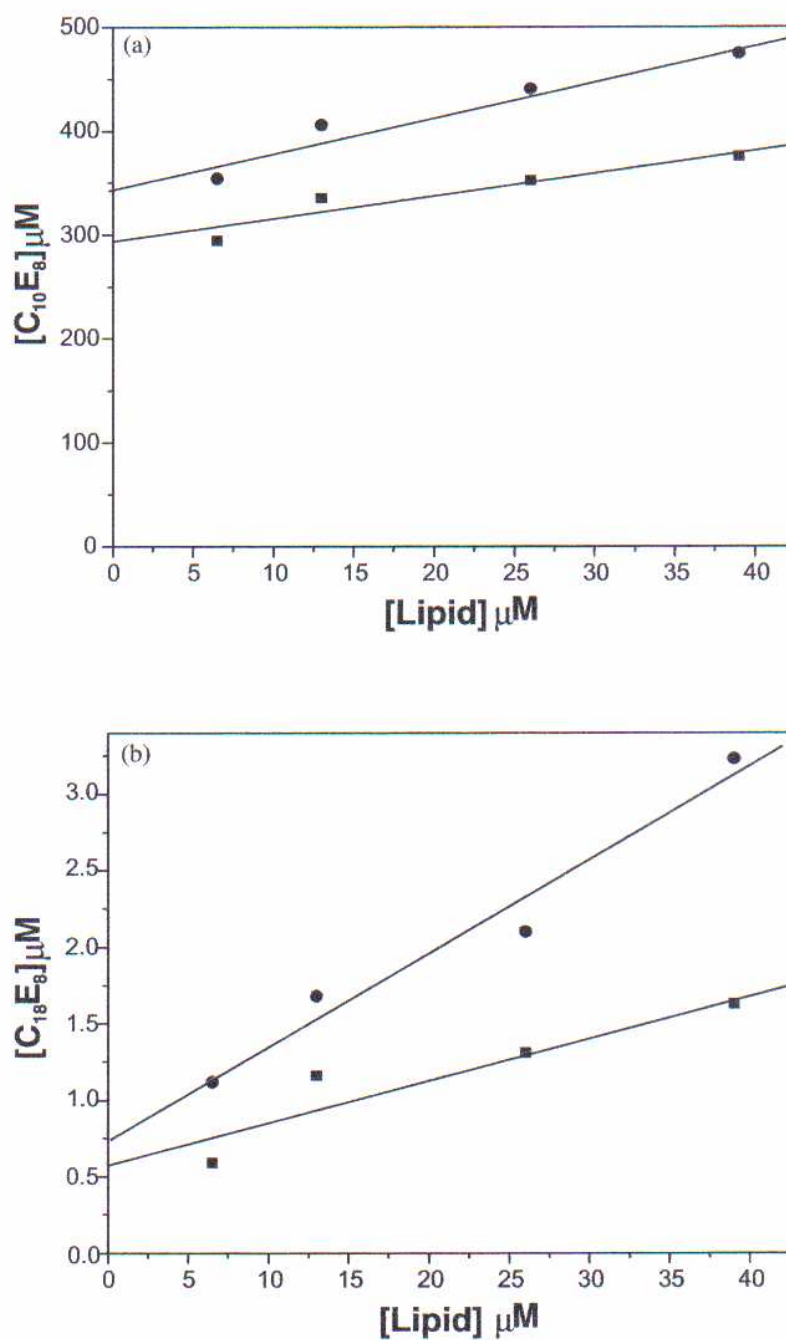


Fig. 3. Effective surfactant/lipid molar ratios for erythrocyte membrane saturation and solubilization: (a) $C_{10}E_8$; (b) $C_{18}E_8$; C^{sat} (■) and C^{sol} (●) were plotted as a function of erythrocyte lipid concentration. R_e values were taken from the slope of the straight lines.

Table 3

Effective surfactant/lipid molar ratios (R_e), cmc (D_w) and binding constant (K_b) in the lysis of erythrocytes by C_nE_8 surfactants and Triton X-100. Experimental condition as in Fig. 3

	$C_{10}E_8$	$C_{12}E_8$	$C_{14}E_8$	$C_{16}E_8$	$C_{18}E_8$	Triton X-100
R_e^{sat}	2.23	0.21	0.13	0.05	0.03	1.58
R_e^{sol}	3.45	0.26	0.18	0.13	0.06	2.15
D_w^{sat} (μM)	291.7	28.7	4.5	1.51	0.61	104.1
D_w^{sol} (μM)	346.4	35.1	4.7	1.56	0.75	188.0
K_b ($\times 10^3 M^{-1}$) ^a	2.4	6.0	25.5	31.5	47.7	5.9

^a Taken from the saturation curves in Fig. 3.

egg phosphatidylcholine bilayers were able to incorporate Triton X-100 up to a detergent/lipid molar ratio of 1:1; the author also reported that at ratios above 2:1, all the lipids were solubilized in mixed micelles. In a further work, Partearroyo et al. [10] described the solubilization of the same phosphatidylcholine vesicles in terms of the effective detergent/lipid molar ratios in the membrane for saturation and solubilization, giving R_e^{sat} and R_e^{sol} values of 0.7:1 and 3:1, respectively [10]. In erythrocytes, Loizaga et al. [37] calculated a Triton X-100/protein ratio of 4.7:1, corresponding to a 4:1 Triton X-100/lipid molar ratio at 50% membrane solubilization.

R_e values for the C_nE_m detergents prove that the extent of solubilization of biological membranes is related to the concentration of the detergent inside the membrane [9], since the higher the binding constant (Table 3), the stronger the lytic effect ($C_{18}E_8 > C_{16}E_8 > C_{14}E_8 > C_{12}E_8 > C_{10}E_8$) in the series.

K_b values reveal high affinities for all the C_nE_m surfactants studied to the erythrocyte membranes, explaining their stronger hemolytic effect, comparable to that of Triton X-100 [38].

The literature reports the anti-lytic effect of the $C_{10}E_8$ to $C_{16}E_8$ surfactants [42,43] and Triton X-100 upon human erythrocyte membranes; at sub-lytic concentrations, C_nE_m induced protection against hyposmotic hemolysis at lower concentrations than SDS, CTAB and zwitterionic detergents of equivalent hydrophobic tails. The pre-lytic stage of surfactant–membrane interaction is directly associated with the amphiphile's insertion into the bilayer [42,43]. In fact, the concentration for maximum protective effect reported for $C_{10}E_8$ to

$C_{16}E_8$ surfactants in hyposmotic erythrocyte membranes at $Ht=1.5\%$ [43] are directly related to the values of C^{sat} and C^{sol} shown here ($R^2=0.99994$ and 0.99998 , respectively; $n=4$). We conclude that as for the pre-lytic stage, lysis is directly associated with the amphiphile's insertion into the bilayer.

Altered ion permeability [41,45,46,48], changes in the asymmetric distribution of components in the outer and inner monolayers of biological membranes [53,54], leading to changes in flip-flop rates [46,47,55–57] and to morphological alterations [24,41,58–61], are events associated with the protective or pre-lytic stage of hemolysis.

The lamella–micelle phase transition induced by surfactants is not so well described and understood. What are the main driving forces in the solubilization process and which steps are involved in the movement of surfactant molecules in-between membrane, water and micelle phases is not yet clear [50]. With the results presented here we have contributed for the understanding of the membrane solubilization process using the model provided by Lichtenberg [12] for the quantitative analysis of hemolysis, showing that hydrophobic interaction and micellization are the main driving forces in the process. Further work devoted to the determination of the structural and dynamic properties of the mixed membranes and mixed micelles (in preparation) should help us to determine the specific events involved in the hemolytic phenomenon, considered in terms of bilayer solubilization.

Acknowledgments

Grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), Fundo

Bunka de Pesquisa-Banco Sumitomo and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Proc. 01/03632-0) are gratefully acknowledged. We are indebted to Dr Maria Helena A. Santana, from FEC/Unicamp, for supplying some of the detergents.

References

- [1] A. Berthod, S. Tomer, J.G. Dorsey, Polyoxyethylene alkyl ether nonionic surfactants: physicochemical properties and use for cholesterol determination in food, *Talanta* 55 (2001) 69–83.
- [2] J. Neugebauer, *A Guide to the Properties and Uses of Detergents in Biology and Biochemistry*, Calbiochem-Novabiochem. Int, La Jolla, 1994.
- [3] N.B. Bam, T.W. Randolph, J.L. Cleland, Stability of protein formulations: investigation of surfactant effects by a novel EPR spectroscopic technique, *Pharm. Res.* 12 (1995) 2–11.
- [4] M.P. Molloy, B.R. Herbert, B.J. Walsh, et al., Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis, *Electrophoresis* 19 (1998) 837–844.
- [5] M.N. Jones, Surfactants in membrane solubilisation, *Int. J. Pharm.* 177 (1999) 137–159.
- [6] J.G. Okun, V. Zickermann, K. Zwicker, U. Brandt, Binding of detergents and inhibitors to bovine complex I—a novel purification procedure for bovine complex I retaining full inhibitor sensitivity, *Biochim. Biophys. Acta* 1459 (2000) 77–87.
- [7] A. Yamamoto, A.M. Luo, S. Dodda-Kashi, V.H.L. Lee, The ocular route for systemic insulin delivery in the albino rabbit, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 249 (1989) 249–255.
- [8] S. Janicki, L. Wolniak, M. Sznitowska, M. Dybowski, Stability of nasal insulin solutions containing sorption promoters, *STP Pharm. Sci.* 10 (2000) 419–424.
- [9] A. Helenius, K. Simons, Solubilization of membranes by detergents, *Biochim. Biophys. Acta* 415 (1975) 29–79.
- [10] M.A. Partearroyo, M.A. Urbaneja, F.M. Goñi, Effective detergent/lipid ratios in the solubilization of phosphatidylcholine vesicles by Triton X-100, *FEBS Lett.* 302 (1992) 138–140.
- [11] E. Galembeck, A. Alonso, N.C. Meirelles, Effects of polyoxyethylene chain length on erythrocyte hemolysis induced by poly[oxyethylene (*n*) nonylphenol] nonionic surfactants, *Chem-Biol. Interact.* 113 (1998) 91–103.
- [12] D. Lichtenberg, Characterization of the solubilization of lipid bilayers by surfactants, *Biochim. Biophys. Acta* 821 (1985) 470–478.
- [13] D. Trägner, A. Csordas, Biphasic interaction of Triton detergents with the erythrocyte membrane, *Biochem. J.* 244 (1987) 605–609.
- [14] J. Bielawski, Two types of haemolytic activity of detergents, *Biochim. Biophys. Acta* 1035 (1990) 214–217.
- [15] A. de La Maza, J.L. Parra, M.T. Garcia, I. Ribosa, J.S. Leal, Permeability changes in the phospholipid bilayer caused by nonionic surfactants, *J. Colloid Int. Sci.* 148 (1992) 310–316.
- [16] B.Y. Zaslavsky, N.N. Ossipov, V.S. Krivich, L.P. Baholdina, S.V. Rogozhin, Action of surface-active substances on biological membranes, *Biochim. Biophys. Acta* 507 (1978) 1–7.
- [17] B.Y. Zaslavsky, N.N. Ossipov, S.V. Rogozhin, Action of surface-active substances of biological membranes. III. Comparison of hemolytic activity of ionic and nonionic surfactants, *Biochim. Biophys. Acta* 510 (1978) 151–159.
- [18] J. Bielawski, L. Mrówczyńska, M. Konarczak, Hemolytic activity of the non-ionic detergents Tween 80 and Triton X-100, *Biol. Bull. Poznan* 32 (1995) 27–41.
- [19] E. Azaz, R. Segal, I. Milo-Goldzweig, Hemolysis caused by polyoxyethylene-derived surfactants evidence for peroxide participation, *Biochim. Biophys. Acta* 646 (1981) 444–449.
- [20] J. Ruiz, F.M. Goñi, A. Alonso, Surfactant-induced release of liposomal contents. A survey of methods and results, *Biochim. Biophys. Acta* 937 (1988) 127–134.
- [21] J.M. Macarulla, A. Alonso, J.L.R. Arrondo, et al., Membrane solubilization by the non-ionic detergent Triton X-100. A comparative study including model and cell membranes, *Rev. Esp. Fisiol.* 45 (1989) 1–8.
- [22] M.B. Ruiz, A. Prado, F.M. Goñi, A. Alonso, An assessment of the biochemical applications of the non-ionic surfactant hecameg, *Biochim. Biophys. Acta* 1193 (1994) 301–306.
- [23] S.V.P. Malheiros, E. de Paula, N.C. Meirelles, Contribution of trifluoperazine/lipid ratio and drug ionization to hemolysis, *Biochim. Biophys. Acta* 1373 (1998) 332–340.
- [24] S.V.P. Malheiros, N.C. Meirelles, E. de Paula, Pathways involved in trifluoperazine, dibucaine and praziquantel induced hemolysis, *Biophys. Chem.* 83 (2000) 89–100.
- [25] M.A. Requero, F.M. Goñi, A. Alonso, The membrane-perturbing properties of palmitoyl-coenzyme A and palmitoylcarnitine. A comparative study, *Biochemistry-US* 34 (1995) 10400–10405.
- [26] D. Lichtenberg, in: M. Shinitzki (Ed.), *Biomembranes. Physical Aspects*, Weinheim, 1993, pp. 63–95.
- [27] E.J. Victoria, L.C. Mahan, Some properties of alkali-extracted red cell ghost membranes, *Biochim. Biophys. Acta* 644 (1981) 226–232.
- [28] M. Esmann, J.C. Skou, Kinetic properties of $C_{12}E_8$ solubilized $(Na^{2+}K^{+})$ -ATPase, *Biochim. Biophys. Acta* 787 (1984) 71–80.
- [29] H.P. Adamo, M.E. Grimaldi, L.M. Bredeston, The N-terminal region of the plasma membrane Ca^{2+} pump does not separate from the main catalytic fragments after proteolysis, *Biochim. Biophys. Acta* 1464 (2000) 127–134.

- [30] J.K. Cho, N. Azuma, C.H. Lee, J.H. Yu, C. Kanno, Purification of membrane-bound lactoferrin from the human milk fat globule membrane, *Biosci. Biotech. Biochem.* 64 (2000) 633–635.
- [31] M. Lachaal, A.L. Rampal, J. Ryu, W. Lee, H. Hah, C.Y. Jung, Characterization and partial purification of liver glucose transporter GLUT2, *Biochim. Biophys. Acta* 1466 (2000) 379–389.
- [32] J.G. Clothier, S.A. Tomellini, Chiral separation of verapamil and related compounds using micellar electrokinetic capillary chromatography with mixed micelles of bile salt and polyoxyethylene ethers, *J. Chromatogr. A* 723 (1996) 179–187.
- [33] E. Park, S. Chang, M. Hahn, S. Chi, Enhancing effect of polyoxyethylene alkyl ethers on the skin permeation of ibuprofen, *Int. J. Pharm.* 209 (2000) 109–119.
- [34] J. Lasch, J. Hoffmann, W.G. Omelyanenko, et al., Interaction of Triton X-100 and octyl glucoside with liposomal membranes at sublytic and lytic concentrations. Spectroscopic studies, *Biochim. Biophys. Acta* 1022 (1990) 171–180.
- [35] K. Edwards, M. Almgren, Kinetics of surfactant-induced leakage and growth of unilamellar vesicles, *Progr. Colloid Polym. Sci.* 82 (1990) 190–197.
- [36] F.H. Kirkpatrick, S.E. Gordesky, G.V. Marinetti, Differential solubilization of proteins, phospholipids, and cholesterol of erythrocyte membranes by detergents, *Biochim. Biophys. Acta* 345 (1974) 154–161.
- [37] B. Loizaga, I.G. Gurtubay, J.M. Macarulla, F.M. Goñi, J.C. Gómez, Membrane solubilization by detergents, and detergent/protein ratios, *Biochem. Soc. Trans.* 7 (1979) 148–150.
- [38] P.S.C. Preté, S.V.P. Malheiros, N.C. Meirelles, E. de Paula, Quantitative assessment of human erythrocyte solubilization by Triton X-100, *Biophys. Chem.* (2002) in press.
- [39] T. Inoue, R. Motoyama, M. Totoki, K. Miyakawa, R. Shimozawa, Molecular aggregates formed in aqueous mixtures of POE type nonionic surfactants and phosphatidylcholines, *J. Colloid. Interface Sci.* 164 (1994) 318–324.
- [40] A.L.F. Baptista, P.J.G. Coutinho, M.E.C.D.R. Oliveira, J.I.N.R. Gomes, Effect of surfactants in soybean lecithin liposomes studied by energy transfer between NBD-PE and N-Rh-PE, *J. Liposome Res.* 10 (2000) 419–429.
- [41] B. Isomaa, H. Hägerstrand, G. Paatero, Shape transformations induced by amphiphiles in erythrocytes, *Biochim. Biophys. Acta* 899 (1987) 93–103.
- [42] H. Hägerstrand, B. Isomaa, Vesiculation induced by amphiphiles in erythrocytes, *Biochim. Biophys. Acta* 982 (1989) 179–186.
- [43] H. Hägerstrand, B. Isomaa, Amphiphile-induced antihaemolysis is not causally related to shape changes and vesiculation, *Chem–Biol. Interact.* 79 (1991) 335–347.
- [44] M. Ohnishi, H. Sagitani, The effect of nonionic surfactant structure on hemolysis, *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 70 (1993) 679–684.
- [45] M. Kellermyer, A. Ludány, A. Miseta, et al., Release of potassium, lipids, and proteins from nonionic detergent-treated chicken red blood cells, *J. Cell. Physiol.* 159 (1994) 197–204.
- [46] A. Miseta, P. Bogner, A. Szarka, et al., Effect of nonlytic concentrations of Brij series detergents on the metabolism-independent ion permeability properties of human erythrocytes, *Biophys. J.* 69 (1995) 2563–2568.
- [47] E. Pantaler, D. Kamp, C.W.M. Haest, Acceleration of phospholipid flip-flop in the erythrocyte membrane by detergents differing in polar head group and alkyl chain length, *Biochim. Biophys. Acta* 1509 (2000) 397–408.
- [48] P. Seeman, Erythrocyte membrane stabilization by local anesthetics and tranquilizers, *Biochem. Pharmacol.* 15 (1966) 1753–1766.
- [49] S. Roth, P. Seeman, The membrane concentrations of neutral and positive anesthetics (alcohols, chlorpromazine, morphine) fit the Meyer–Overton rule of anesthesia; negative narcotics do not, *Biochim. Biophys. Acta* 255 (1972) 207–219.
- [50] S. Schreier, S.V.P. Malheiros, E. de Paula, Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects, *Biochim. Biophys. Acta* 1508 (2000) 210–234.
- [51] D. Lichtenberg, E. Opatowski, M. Koslov, Phase boundaries in mixtures of membrane-forming amphiphiles and micelle-forming amphiphiles, *Biochim. Biophys. Acta* 1508 (2000) 1–19.
- [52] E.A. Dennis, Formation and characterization of mixed micelles of the nonionic surfactant Triton X-100 with egg, dipalmitoyl, and dimyristoyl phosphatidylcholines, *Arch. Biochim. Biophys.* 165 (1974) 764–773.
- [53] J.Y. Chen, W.H. Huestis, Role of membrane lipid distribution in chlorpromazine-induced shape change of human erythrocytes, *Biochim. Biophys. Acta* 1323 (1997) 299–309.
- [54] A.J. Verkleij, J. Leunissenbijvelt, B. de Kruijff, M. Hope, P.R. Cullis, Non-bilayer structures in membrane-fusion, *Ciba Found. Symp.* 103 (1984) 45–54.
- [55] M. Seigneuret, P.F. Devaux, ATP dependent asymmetric distribution of spin labelled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes, *P. Natl. Acad. Sci-Biol. USA* 81 (1984) 3751–3755.
- [56] J. Rosso, A. Zachowski, P.F. Devaux, Influence of chlorpromazine on the transverse mobility of phospholipids in the human-erythrocyte membrane-relation to shape changes, *Biochim. Biophys. Acta* 942 (1988) 271–279.
- [57] S.L. Schrier, A. Zachowski, P. Hervé, J. Kader, P.F. Devaux, Transmembrane redistribution of phospholipids of the human red cell membrane during hypotonic hemolysis, *Biochim. Biophys. Acta* 1105 (1992) 170–176.
- [58] B. Deuticke, Transformation and restoration of biconcave shape of human erythrocytes induced by amphiphilic agents and shapes of ionic environment, *Biochim. Biophys. Acta* 163 (1968) 494–500.

- [59] M.S. Bretscher, Membrane structure—some general principles, *Science* 181 (1973) 622–629.
- [60] M.P. Sheetz, S.J. Singer, Biological membranes as bilayer couples a molecular mechanism of drug–erythrocyte interaction, *P. Natl. Acad. Sci-Biol. USA* 71 (1974) 4457–5561.
- [61] A. Iglic, V. Kralj-Iglic, B. Bozic, M. Robrowska-Hägerstrand, B. Isomaa, H. Hägerstrand, Torocyte shapes of red blood cell daughter vesicles, *Bioelectroch.* 52 (2000) 203–211.
- [62] W.C. Griffin, Classification of surface-active agents by HLB, *J. Soc. Cosmet. Chem.* 1 (1949) 311–319.

4.3 MULTIPLE STAGES OF DETERGENT-ERYTHROCYTE MEMBRANE INTERACTION – A SPIN LABEL STUDY

Multiple stages of detergent-erythrocyte membrane interaction – A spin label study

Paulo S. C. Preté,[‡] Eneida de Paula,^{‡} Nilce C. Meirelles,[‡] Sônia V. P. Malheiros,[§] Félix M. Goñi,[†] and Shirley Schreier[⊥]*

[‡]Department of Biochemistry, Institute of Biology, State University of Campinas, C.P. 6109, 13083-970, Campinas, SP, Brazil.

[§]Department of Biology and Physiology, Faculty of Medicine of Jundiaí, Jundiaí, SP, Brazil.

[†]Department of Biochemistry, Faculty of Science, University of the Basque Country, Bilbao, Spain.

[⊥]Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

*Corresponding author: Fax: +55-19-37886129, e-mail: depaula@unicamp.br

Running Title: **Detergent-Erythrocyte Interaction. A Spin Label Study**

¹ Abbreviations: CMC, critical micelle concentration; EPR, electron paramagnetic resonance; Hb, hemoglobin; Ht, hematocrit; PBS, phosphate buffered saline; RBC, red blood cell; RH, percent relative hemolysis; 5-DSA, 5-doxyyl stearic acid; Triton X-100 or TTX-100, t-Octylphenoxypolyethoxyethanol.

ABSTRACT: The various stages of detergent-membrane interaction were investigated for the system Triton X-100 (TTX-100) – intact red blood cells (RBC) in a broad range of detergent concentrations. The interaction was monitored by following hemolysis as assessed by hemoglobin (Hb) release, by phospholipid phosphate release, and by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. Hb and phosphate were determined in supernatants after addition of detergent and subsequent centrifugation. EPR spectra were obtained for a fatty acid spin probe, 5-doxyl stearic acid (5-DSA), intercalated in whole RBC, pellets and supernatants. Calculation of order parameters (S) allowed the characterization of the various structures formed in the different stages of detergent-membrane interaction. The data provided evidence for the validity of the Lichtenberg model for membrane solubilization by a nonionic detergent with regard to the existence of effective molar ratios for membrane saturation (R^{sat}) and solubilization (R^{sol}). These ratios are similar to those previously found for pure lipid bilayers. In addition, the results indicate that a more complex series of events occur, demonstrating the formation of pores at low detergent/lipid molar ratios (D/L) responsible for an increase in permeability. This is followed by the appearance of intermediary membrane fragments that are released to the supernatant, probably due to detergent binding. Calculated order parameters revealed that whole cells and pellets possessed a similar degree of molecular packing, while the supernatant membrane-like fragments displayed a slightly higher degree of molecular order. As the D/L increased, pellets were not detected anymore and the supernatants gave rise to spectra that yielded smaller order parameters, approaching that of pure TTX-100 micelles, indicating full membrane solubilization.

Detergents have the ability to wet surfaces, penetrate soil, and solubilize fatty materials. In addition, they exert microbicidal effects. Detergents are amphiphilic molecules, containing both polar and non-polar regions, and are broadly classified as cationic, anionic, nonionic or zwitterionic, depending on the nature of their polar head group (1, 2). Detergents are widely used in studies of biological and model membranes. These amphiphiles are employed to solubilize membrane components, in particular to purify specific proteins.

The interest in detergent-membrane interaction concerns also the physico-chemical and molecular aspects of this interaction. One interesting aspect is the interplay between bilayer and micellar structure as a function of the concentrations of the lipid and Detergent components, as well as their molar ratio. Theoretical and experimental work has shown that several steps take place during lipid bilayer-detergent interaction. Three main stages can be envisioned: at low detergent concentration and low detergent:lipid molar ratios (D/L), molecules of the Detergent are inserted into the lipid bilayer, until a limiting saturation concentration, C^{sat} , is reached. Subsequently, lipids are extracted from the bilayer by already formed micelles, giving rise to the co-existence of detergent-containing bilayers and lipid-containing micelles. As the detergent concentration increases further, total bilayer solubilization occurs (at a detergent concentration C^{sol}). Further Detergent addition leads to micelles with increasing D/L molar ratios (3).

In the case of biological membranes, protein solubilization may also occur. In recent years it has been found that certain lipid (sphingolipids and cholesterol) and protein (*e.g.*, GPI anchor proteins) components of biological membranes are resistant to detergent (in particular TTX-100) extraction, giving rise to so called detergent resistant membranes (DRM), (4). These domains have been also reported in erythrocytes (5-8) and are postulated to be the contact region for the penetration of pathogens into cells (9). The selective uptake of detergent resistant membrane proteins was demonstrated in erythrocytes during malarial infection (10).

Among the approaches used in the study of detergent-membrane interactions, spectroscopic techniques have been largely employed (11). Spin labeling EPR has been one of the most important spectroscopic tools in providing information about

molecular order and dynamics of bilayer (12-14) and micelle components (15). Spin label spectra are highly sensitive to effects on molecular organization caused by the partitioning of solutes into bilayers (16-18) and have been used to investigate the interaction between Detergents and model or biological membranes (2, 19, 20), as well as protein-detergent interactions (21, 22). These studies showed that detergent incorporation into the bilayer decreases the molecular order and increases the mobility of the phospholipid hydrocarbon chains (2, 19, 23-26). Moreover, spectra of spin-labeled fatty acids were used to distinguish the packing properties of DRM from those of intact erythrocyte membranes (7). However, no study making use of spin labeling EPR has dealt with the whole ensemble of events involved in detergent-membrane interaction.

TTX-100 is a nonionic detergent, commonly used in studies of biomembranes (27-29). The solubilization of lipid membranes triggered by TTX-100 is a well-described phenomenon. TTX-100 is the most commonly used detergent to obtain DRM (30). The hemolytic action of this detergent has also been widely studied (20, 21, 31-35). Recently we published a quantitative analysis of the hemolytic effect of TTX-100 on human erythrocyte membranes (36), employing the model described by Lichtenberg (3, 37).

Here we present a comprehensive study of the effect of TTX-100 upon membranes of human erythrocytes, encompassing a broad range of D/L ratios, at detergent concentrations varying from below to above TTX-100 critical micelle concentration (CMC). The assessment of hemolysis, the determination of phospholipid phosphate, and the analysis of EPR spectra of a fatty acid spin probe (5-doxyl stearic acid, 5-DSA) incorporated in whole cells, pellets and supernatants allowed the characterization of the structures (bilayers, lipid-detergent mixed bilayers, detergent-lipid mixed micelles, and micelles) present at each D/L examined. Thus each step of the detergent solubilization process has been characterized using the same spectroscopic technique.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. 5-doxy stearic acid (5-DSA) and TTX-100 were from Sigma Chemical Co. All other reagents were of analytical grade.

Hemolytic assay and phospholipid phosphate determination. Human blood was freshly collected in a blood bank. Erythrocytes were obtained by centrifuging three times at 260 x g for 3 min with 5 mM phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4. The supernatants were discarded. Variable TTX-100 concentrations were added to the erythrocyte suspensions to a final hematocrit (Ht) of 40 % and the samples were kept for 15 min at 37 °C. After centrifugation at 260 x g for 3 min, the concentration of hemoglobin (Hb) released in the supernatant was measured at 412 nm, as described before (38). The phospholipid concentration in the supernatant was determined as inorganic phosphate according to Chen *et al* (39). The extent of hemolysis, expressed as Relative Hemolysis (RH), was determined on the basis of released Hb or phosphate in the supernatant, according to Eq. 1 (38):

$$RH = \frac{A_s - A_{c1}}{A_{c2} - A_{c1}} \times 100 \quad (1)$$

where A_s , A_{c1} , and A_{c2} are the absorbance at 412 nm of the sample, the mechanical hemolysis control (erythrocytes in PBS), and the 100 % hemolysis control (erythrocytes in water), respectively. Each experiment was run in triplicate; RH values represent the mean of three independent experiments.

EPR studies of TTX-100 micelles. Films of 5-DSA were prepared by evaporating a stock chloroform solution of the spin label under a stream of N_2 . The remaining solvent was removed under vacuum for 2 h. PBS buffer was added to produce a final concentration of 1.10^{-5} M 5-DSA and the samples were vortexed for about 5 min. Aliquots of a TTX-100 stock solution were added in order to obtain a range of detergent concentrations. EPR spectra were recorded in 0.2 mL flat quartz cells (Wilmad Glass Co., Buena, NJ), at room temperature (22 ± 2 °C), in a Bruker EMX spectrometer, operating at 9 GHz and 3.4 kG.

EPR studies of erythrocytes. 5-DSA films were prepared as described above and erythrocytes (80 % Ht) were added so that the final spin label concentration did

not exceed 2 mole % of erythrocyte membrane lipid (18). The samples were gently shaken for 15 min at 37 °C, TTX-100 was added to the erythrocyte suspensions to reach a final Ht of 40 %, and the samples were kept for 15 min at 37 °C. EPR spectra were obtained for the whole erythrocyte suspension (before centrifugation), and for the supernatant and the pellet (after centrifugation at 260 x g during 3 min) as described above.

Analysis of EPR spectra. Calculation of the order parameter. The orientation of the lipid long molecular axis with respect to the bilayer normal can be evaluated by calculating the order parameter S, from the EPR spectra of a reporter molecule (spin label) inserted in the membrane (12). S reflects the angular amplitude of anisotropic motion of the reporter molecule and is determined making use of Eq. 2:

$$S = \frac{2A_{//} - 2A_{\perp}}{2[A_{zz} - (A_{xx} + A_{yy})/2]} \quad (2)$$

where $2A_{//}$ and $2A_{\perp}$ are the separations between the outer and inner extrema, respectively, in the experimental spectrum (these features are clearly seen in Figure 4). $A_{//}$ (A_{\perp}) is the hyperfine splitting corresponding to spin labels whose long molecular axes are oriented approximately parallel (perpendicular) to the external magnetic field. A_{xx} , A_{yy} , and A_{zz} are the values of the principal components of the hyperfine tensor ($A_{zz} = 32.0$ G, $A_{xx} = A_{yy} = 6.0$ G) (13). For stearic acid spin labels the long molecular axis is approximately parallel to the nitroxide z axis (the direction of the $p\pi$ orbital that contains the unpaired electron), the x axis is parallel to the N-O bond, and the y axis is perpendicular to x and z. The larger the value of S, the smaller the amplitude of motion and the more ordered the lipid chains. S varies from 0 (in isotropic systems) to 1 (for a perfectly oriented molecule) (13). Corrections for A_{\perp} and for polarity were not included in the equation.

RESULTS

Release of hemoglobin and membrane phospholipid to the supernatant. Figure 1 presents the curves corresponding to Hb and phospholipid released from erythrocyte suspensions (40 % Ht) under isotonic conditions, pH 7.4, as a function of TTX-100 concentration. Both were determined in supernatants after sample centrifugation. The curves can be divided into four regions: i) between 0.1 and 0.3 mM TTX-100, where RH raises slowly with increasing detergent concentration, ii) between 0.3 and 0.7 mM TTX-100 where the slope is much greater, iii) between 0.7 and 0.9-1.0 mM TTX-100 where the curve raises very steeply, and finally, iv) above 1 mM TTX-100, where hemolysis reaches 100%. We have ascribed the concentration of 0.3 mM TTX-100 to the beginning of the hemolytic process. The appearance of lipid phosphate in the supernatant follows a very similar pattern.

Figure 1

Spin label study of detergent-erythrocyte interaction. The model developed by Lichtenberg to describe the various phenomena taking place in bilayer-detergent interaction is widely accepted in the literature and frequently applied in the analysis of these systems. According to this model, a sequence of stages is envisioned: 1- at low D/L molar ratios, the detergent molecules intercalate in the lipid bilayer, altering the molecular organization; 2- at membrane saturation, micelles start to form containing both lipid and detergent. At this stage, mixed lipid-detergent bilayers coexist with mixed detergent-lipid micelles; 3- at a sufficiently high D/L ratio, the bilayer undergoes total solubilization and only mixed micelles remain. As the detergent concentration increases, the micelle approaches the composition (and, presumably, the structural properties) of the pure detergent micelle.

In order to investigate the structural properties of the various aggregates resulting from the interaction of erythrocytes at 40 % hematocrit with variable TTX-100 concentrations, the lipid spin probe 5-DSA was incorporated in RBC and EPR spectra were run for whole cells, and for pellets and supernatants obtained upon centrifugation. The amphiphilic character of the fatty acid spin probe drives its

intercalation between the molecular components of aggregates such as micelles and bilayers.

Figure 2 presents the EPR spectra of 5-DSA in whole RBC (left column), in supernatants (center column), and in pellets (right column) obtained after centrifugation in the presence of variable TTX-100 concentration. The Figure shows that the spectral intensity of the pellet corresponds to the majority of the label population at the lower detergent concentrations. This population decreases stepwise up to 0.6 mM detergent and is not detectable at higher TTX-100 concentrations. In contrast, the spectra corresponding to supernatant display very weak intensity up to 0.6 mM TTX-100, suggesting that at low detergent concentration the population of aggregates in this fraction is very small. This situation is reversed for higher detergent concentrations. At 0.9 mM TTX-100 and above, while essentially no pellet spectrum is detected, the supernatant spectra display much higher intensity than at the lower detergent concentrations. It is noteworthy that 0.3 mM and 0.9 mM are the approximate detergent concentrations at which hemolysis started and finished, respectively, and also correspond to the beginning and end of phosphate release to the supernatant.

Figure 2

Table 1 presents the values of order parameters calculated for the spectra of 5-DSA in whole RBC, supernatants, pellets, and pure TTX-100 micelles (see below). For RBC in the presence of variable detergent concentration, three different regions can be distinguished: i) between 0 and 0.4 mM detergent, where the values of S ranged from 0.689 to 0.711 for whole RBC. Very similar values were obtained for the pellet (0.695-0.707), suggesting that incorporation of the detergent did not cause a significant effect on bilayer organization. In this region the supernatant yielded essentially undetectable spectra. ii) between 0.5 and 0.9 mM detergent, where S for whole RBC ranged between 0.667 and 0.677, while the supernatant yielded slightly higher, also approximately constant, S values (0.689-0.702). Spectra of the pellet were detectable for 0.5 and 0.6 mM TTX-100, however, the amounts of pellet for 0.7 and 0.8 mM TTX-100 were not sufficient to obtain EPR spectra; iii) 1.0 mM TTX-100

and above. The values of S decreased and were very similar for both whole RBC and supernatant. In this concentration range essentially no pellet was detected; therefore, RBC and supernatant were essentially equivalent. At the highest detergent concentrations (25 mM and above) the spectra, and consequently, the values of S approached those of pure TTX-100 micelles (see below).

Table 1

A plot of S as a function of TTX-100 concentration (Figure 3) shows that the order parameter suffered small changes up to approximately 2.5 mM detergent, decreased steeply between 2.5 and 10 mM TTX-100, and changed less sharply between 10 and 50 mM detergent. This behavior was very similar for both whole RBC and supernatants. The data are compared to the relative hemolysis as a function of detergent concentration. The Figure clearly shows that both parameters do not display a parallel behavior. The interpretation for this discrepancy will be discussed in the Discussion.

Figure 3

Spin label study of TTX-100 micelles. Spectra of 5-DSA in pure TTX-100 micelles were obtained in order to compare with those of detergent-treated RBC. Figure 4 shows the EPR spectra of 5-DSA in the presence of variable TTX-100. Spectra of the label tumbling freely in solution are seen in PBS buffer (a) and at 0.1 mM detergent (b). As the detergent concentration increases, a spectrum due to motionally restricted label appears (c-f). The appearance of this spectrum occurs in the concentration range of the detergent's reported CMC (0.23-0.3 mM (40)). For TTX-100 concentrations between 0.4 and 0.7 mM, the spectra due to more immobilized label do not display outer and inner extrema and evince some exchange broadening (see Figure 4c for 0.5 mM TTX-100). The spectra also show that at the lower TTX-100 concentrations, 5-DSA partitions between the aqueous phase and the micelles. As the micelle concentration increases, the spin label increasingly partitions into the micelle, until no more label remains free in the aqueous phase. Inner and

outer extrema could be measured at 0.8 mM TTX-100 and above, allowing the calculation of order parameters (Table 1). It is noteworthy that the spectra of 5-DSA in TTX-100 micelles present inner and outer extrema (Figure 4), although the order parameter is smaller than in bilayers (Table 1). The appearance of inner and outer extrema is in contrast with data reported for other well known micellar systems (15, 41). The lack of these features in the spectra of micelles has been ascribed to the small micellar size and the fast tumbling of the molecules within the aggregate.

Figure 4

The presence of inner and outer extrema in the spectra of 5-DSA incorporated in TTX-100 micelles indicates that these aggregates are larger and/or more tightly packed than the previously studied micelles. Indeed, in studies of TTX-100 micelles Robson and Dennis have suggested that they consist of oblate ellipsoid aggregates with semiaxes of 2.7 and 5.2 nm (40). A calculation of the particle's rotational correlation time, τ , making use of the Stokes-Einstein equation (Eq. 3)

$$\tau = \frac{4\pi r^3 \eta}{3kT} \quad (3)$$

where r (assumed as 4.0 nm, the average of 2,7 and 5,2 nm,), η , k , and T are the particle radius, viscosity, Boltzmann constant, and temperature, respectively, yields $\tau = 5.1 \times 10^{-8}$ s. This means that the particle's tumbling rate is slow in the timescale of the EPR experiment, which could account for the occurrence of inner and outer extrema in the spin label spectra. Very likely, the chemical structure of the nonionic detergent also contributes to a tighter packing than in smaller, ionic detergent micelles.

DISCUSSION

On the basis of previous suggestions by Helenius and Simons (42), Lichtenberg proposed a mechanism for the solubilization of membranes by detergents, describing the process as a membrane-to-micelle transition (3, 37) with the transient formation of mixed membranes and mixed micelles, composed by lipids, proteins and detergent molecules. Goñi and coworkers used this approach to study the solubilization of lipid and biological membranes by different nonionic detergents (28, 43, 44). In this model, the detergent is proposed to partition into the bilayer until reaching a saturating detergent/lipid (D/L) molar ratio. At higher D/L molar ratios, mixed lipid-detergent bilayers coexist with mixed detergent-lipid micelles. The further increase of detergent leads to increased membrane solubilization with the formation of detergent micelles with increasing D/L molar ratios. In the range of mixed bilayer-mixed micelle coexistence, the composition of both aggregates remains constant (3). Evidently, in the case of biological membranes that contain a variety of lipids in addition to proteins, one might envision a much more complex series of events. At the end of the solubilization process, one very likely ends up with a polydisperse system consisting of a collection of aggregates of variable size and composition. With regard to proteins, it has been reported that, in some cases, part of these molecules precipitate (27, 45).

In our previous work (36), we have examined the interaction between TTX-100 and membranes of human erythrocytes when intact RBC are exposed to increasing detergent concentrations. These studies were performed at lower membrane concentration than in the present work. The beginning and end of hemolysis were taken as an indication of the achievement of bilayer saturation by the detergent and of the end of membrane solubilization, respectively, and the detergent concentrations at both points were termed C^{sat} and C^{sol} , respectively (117-184 and 192-255 μM).

In the present study, the goal was to make use of spin label spectra in order to characterize the structural and dynamic properties of the aggregates formed upon the interaction between TTX-100 and the membranes of human erythrocytes when intact RBC are exposed to increasing detergent concentrations. However, the use of the spin labeling technique requires much higher membrane concentrations than those

used previously. The results showed that under the conditions used in the present work, a more complex picture emerges, as evidenced by the following observations:

1- Figure 1 shows that the concentrations of TTX-100 for the beginning and end of hemolysis are approximately 0.3 and 0.9 mM, respectively. Taking into account that these concentrations correspond to D/L molar ratios of approximately 0.08 and 0.26, clearly these are much smaller than those found previously for erythrocytes (1.5 and 2.1, respectively) (36), or for phospholipid bilayers (0.7 and 3.0, respectively) (28), or 0.64 and 2.5, respectively) (46).

2- EPR spectra indicate the presence of low signal intensities in the supernatant starting at concentrations as low as 0.3 mM TTX-100. The intensity of the spectra increase considerably at 0.9 mM detergent, and at the same time, the amount of pellet is essentially undetectable at this concentration (Figure 2 and Table 1). An examination of the variation of the order parameter (Table 1) reveals that the values of S decrease very slowly between 0.1 and 2.5 mM TTX-100 and are similar for whole cells, pellet and supernatant. Figure 3 shows a steeper decline in the values of S between 2.5 and 10 mM TTX-100, and a slower decrease up to 50 mM detergent, reaching those of the pure detergent micelles (Table 1). The concentrations of 2.0 mM and 10 mM correspond to D/L of 0.6 and 2.8, in excellent agreement with the effective molar ratios reported for membrane saturation and solubilization in pure lipid bilayers (28, 47).

How can these findings be reconciled? We propose that the initial incorporation of TTX-100 into the bilayer leads to an increase in permeability which, due to a colloid osmotic imbalance, causes formation of pores of size sufficient to allow the release of hemoglobin. Previous studies of detergent-membrane interaction have demonstrated that detergent intercalation into intact membranes causes an increase in permeability prior to the beginning of solubilization. (44, 46). Chernitsky and Senkovich (48) have evaluated that the diameter of detergent-induced pores in erythrocytes is of the order of 4 nm. The size of Hb is 5.5 nm (49), thus it is quite plausible that the protein would exit through these pores.

The presence of a supernatant at D/L lower than R^{sat} as evinced by the EPR spectra (Figure 2) and the determination of phospholipid (Figure 1) in this fraction

suggest the formation of membrane fragments (or vesicles) small enough to remain in the supernatant upon low-speed centrifugation. This hypothesis is corroborated by the similarity of S values for whole cells and supernatant (Figure 3 and Table 1). This picture is in agreement with work on the solubilization of membranes containing the Ca^{2+} -ATPase, where the authors describe the appearance of different aggregates prior to solubilization (50). It is noteworthy that in this work a greater variety of stages (and aggregates) was found with TTX-100. The authors proposed a model for non-cooperative detergent insertion in the bilayer to account for changes in bilayer molecular packing and, therefore, permeability, and for cooperative formation of edges, creating the curvature that would allow the formation of fragments of limited size.

The presence of small membrane fragments in the supernatant at low D/L ratios is clearly evinced in the present study. Table 1 shows that the membrane fragments in the supernatants possess somewhat higher order parameters than the pellets, suggesting that the fragments could be enriched in cholesterol and sphingolipids. Note that DRM are described as enriched in those lipids (8).

The membrane-like fragments obtained at low D/L ratios persist until the value of R^{sat} (0.6, 2.0 mM detergent) is reached. Subsequently, as the detergent concentration increases, R^{sol} is reached (D/L 2.8, 10 mM detergent) and membrane solubilization effectively occurs. As the D/L ratio increases, mixed lipid-detergent and protein-detergent micelles prevail that approach the composition and molecular organization of pure detergent micelles. This is also evinced by the EPR spectra (compare Figures 2 and 4) and by the values of order parameters (Table 1 and Figure 3).

In conclusion, the present data provide evidence for the validity of the Lichtenberg model for membrane solubilization by a nonionic detergent with regard to the existence of effective molar ratios for membrane saturation and solubilization. These ratios are similar to those previously found for pure lipid bilayers. In addition, the results indicate that a more complex series of events occur, clearly demonstrating the formation of pores responsible for an increase in permeability, followed by the formation of intermediary membrane fragments that are released to the supernatant,

probably due to the binding of detergent which allows the formation of edges surrounding these fragments. The EPR spectra of the intercalated spin probe allowed for the characterization of the various structures formed in the different stages of detergent-membrane interaction.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by grants from FAPESP to SS and EP. PSCP is recipient of a Ph.D. fellowship from CAPES. SS and EP are CNPq research fellows.

REFERENCES

1. Effendy, I., and Maibach, H. I. (1995) Detergents and experimental irritant contact dermatitis, *Contact Dermatitis* 33, 217-225.
2. Glover, R. E., Smith, R. R., Jones, M. V., Jackson, S. K., and Rowlands, C. C. (1999) An EPR investigation of detergent action on bacterial membranes, *FEMS Microbiol. Lett.* 177, 57-62.
3. Lichtenberg, D., Opatowski, E., and Kozlov, M. M. (2000) Phase boundaries in mixtures of membrane-forming amphiphiles and micelle-forming amphiphiles, *Biochim. Biophys. Acta.* 1508, 1-19.
4. Brown, D. A., and Rose, J. K. (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface, *Cell* 68, 533-544.
5. Samuel, B. U., Mohandas, N., Harrison, T., McManus, H., Rosse, W., Reid, M., and Haldar, K. (2001) The role of cholesterol and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins of erythrocyte rafts in regulating raft protein content and malarial infection, *J. Biol. Chem.* 276, 29319-29329.
6. Salzer, U., and Prohaska, R. (2001) Stomatin, flotillin-1, and flotillin-2 are major integral proteins of erythrocyte lipid rafts, *Blood* 97, 1141-1143.

7. Rivas, M. G., and Gennaro, A. M. (2003) Detergent resistant domains in erythrocyte membranes survive after cell cholesterol depletion: an EPR spin label study, *Chem. Phys. Lipids* 122, 165-169.
8. Shogomori, H., and Brown, D. A. (2003) Use of detergents to study membrane rafts: the good, the bad, and the ugly, *Biol. Chem.* 384, 1259-1263.
9. Manes, S., del Real, G., and Martinez, A. C. (2003) Pathogens: raft hijackers, *Nature Rev. Immunol.* 3, 557-568.
10. Murphy, S. C., Samuel, B. U., Harrison, T., Speicher, K. D., Speicher, D. W., Reid, M. E., Prohaska, R., Low, P. S., Tanner, M. J., Mohandas, N., and Haldar, K. (2004) Erythrocyte detergent-resistant membrane proteins: their characterization and selective uptake during malarial infection, *Blood* 103, 1920-1928.
11. Goñi, F. M., and Alonso, A. (2000) Spectroscopic techniques in the study of membrane solubilization, reconstitution and permeabilization by detergents, *Biochim. Biophys. Acta* 1508, 51-68.
12. Hubbel, W. L., and McConnell, H. M. (1971) Molecular motion in spin-labeled phospholipids and membranes, *J. Am. Chem. Soc.* 93, 314-326.
13. Schreier, S., Polnaszek, C. F., and Smith, I. C. P. (1978) Spin labels in membranes, *Biochim. Biophys. Acta* 515, 375-436.
14. Marsh, D. (1975) Spectroscopic studies of membrane structure, *Essays Biochem.* 11, 139-180.
15. Schreier, S., Ernandes, J. R., Cuccovia, I. M., and Chaimovich, H. (1978) Spin label studies of structural and dynamic properties of detergent aggregates, *J. Magn. Res.* 30, 283-298.
16. Schreier, S., Frezzatti, W. A., Araujo, P. S., Chaimovich, H., and Cuccovia, I. M. (1984) Effect of lipid membranes on the apparent pK of the local anesthetic tetracaine. Spin label and titration studies, *Biochim. Biophys. Acta* 769, 231-237.
17. Lissi, E., Bianconi, M.L., Amaral, A., T., de Paula, E., Blanch, L. E. B., and Schreier, S. (1990) Methods for the determination of partition coefficients based on the effect of solutes upon membrane structure, *Biochim. Biophys. Acta* 1021, 46-50.

18. de Paula, E., and Schreier, S. (1995) Use of a novel method for determination of partition coefficients to compare the effect of local anesthetics on membrane structure, *Biochim. Biophys. Acta* 1240, 25-33.
19. Mizushima, J., Kawasaki, Y., Tabohashi, T., Kitano, T., Sakamoto, K., Kawashima, M., Cooke, R., and Maibach, H. I. (2000) Effect of detergents on human stratum corneum: electron paramagnetic resonance study, *Int. J. Pharm.* 197, 193-202.
20. Jones, M. N. (1999) Surfactants in membrane solubilisation, *Int. J. Pharm.* 177, 137-159.
21. Bam, N. B., Randolph, T. W., and Cleland, J. L. (1995) Stability of protein formulations: Investigation of surfactant effects by a novel EPR spectroscopic technique, *Pharm. Res.* 122, 2-11.
22. Jones, L. S., Cipolla, D., Liu, J., Shire, S. J., Randolph, T. W. (1999) Investigation of protein-surfactant interactions by analytical ultracentrifugation and electron paramagnetic resonance: the use of recombinant human tissue factor as an example, *Pharm. Res.* 16, 808-812.
23. Sersen, F., Leitmanová, A., Devínsky, F., Lacko I., and Balgavy, P. (1989) A spin label study of perturbation effects of *N*-(1-methyldodecyl)-*N,N,N*-trimethylammonium bromide and *N*-(1-methyldodecyl)-*N,N*-dimethylamine oxide on model membranes prepared from *Escherichia coli*-isolated lipids. *Gen. Physiol. Biophys.* 8, 133–156.
24. Galembeck, E., Alonso, A., and Meirelles, N. C. (1998) Effects of polyoxyethylene chain length on erythrocyte hemolysis induced by poly[oxyethylene (n) nonylphenol] non-ionic surfactants. *Chem. Biol. Interact.* 113, 91–103.
25. Kawasaki, Y., Quan, D., Sakamoto, K., and Maibach, H. I. (1997) Electron resonance studies on the influence of anionic surfactants on human skin. *Dermatology* 194, 238–242.
26. Gallová, J., Devínsky F., and Balgavy, P. (1990) Interaction of surfactants with model and biological membranes. II. Effect of *N*-alkyl-*N,N,N*-trimethylammonium ions on phosphatidylcholine bilayers as studied by spin probe ESR. *Chem. Phys. Lipids* 53, 231–241.

27. Gurtubay, J. I. G., Goñi, F. M., Gómez-Fernández, J. C., Otamendi, J. J., and macarulla, J. M. (1980) Triton X-100 solubilization of mitochondrial inner and outer membranes. *J. Bioenerg. Biomemb.* 12, 47-70.
28. Partearroyo, M. A., Urbaneja, M. A., and Goñi, F. M. (1992) Effective detergent/lipid ratios in the solubilization of phosphatidylcholine vesicles by Triton X-100, *FEBS Lett.* 302, 138-140.
29. Bielawski, J., Mrówczyńska L., and Konarczak, M. (1995) Hemolytic activity of the non-ionic detergents Tween 80 and Triton X-100, *Biol. Bull. Poznan* 32, 27-41.
30. Chamberlain, L.H. (2004) Detergents as tools for the purification and classification of lipid rafts, *FEBS Lett.* 13;559, 1-5.
31. Trägner, D., and Csordas, A., (1987) Biphasic interaction of Triton detergents with the erythrocyte membrane, *Biochem. J.* 244, 605-609.
32. Bielawski, J. (1990) Two types of haemolytic activity of detergents, *Biochim. Biophys. Acta* 1035, 214-217.
33. de La Maza, A., Parra, J. L., Garcia, M. T., Ribosa I., and Leal, J. S. (1992) Permeability changes in the phospholipid bilayer caused by nonionic surfactants, *J. Colloid Interf. Sci.* 148, 310-316.
34. Molloy, M. P., Herbert, B. R., Walsh, B. J., Tyler, M. L., Traini, M., Sanchez, J. C., Hochstrasser, D. F., Williams K. L., and Gooley, A. A. (1998) Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis, *Electrophoresis* 19, 837-844.
35. Okun, J. G., Zickermann, V., Zwicker K., and Brandt, U. (2000) Binding of detergents and inhibitors to bovine complex I – a novel purification procedure for bovine complex I retaining full inhibitor sensitivity, *Biochim. Biophys. Acta* 1459, 77-87.
36. Preté, P. S. C., Malheiros, S. V. P., Meirelles N. C., and de Paula, E. (2002) Quantitative assessment of human erythrocyte membrane solubilization by Triton X-100, *Biophys. Chem.* 97, 1-5.
37. Lichtenberg, D. (1985) Characterization of the solubilization of lipid bilayers by surfactants, *Biochim. Biophys. Acta* 821, 470-478.

38. Malheiros, S. V. P., de Paula, E., and Meirelles, N. C. (1998) Contribution of trifluoperazine/lipid ratio and drug ionization to hemolysis, *Biochim. Biophys. Acta* 1373, 332-340.
39. Chen, P. S., Toribara, Jr. T. Y., and Warner, H. (1956) Microdetermination of phosphorus, *Anal. Chem.* 28, 1756-1758.
40. Robson, R. J., and Dennis, E. A. (1977) The size, shape and hydration of nonionic surfactant micelles. Triton X-100, *J. Phys. Chem.* 81, 1075-1078.
41. Ernandes, J. R., Chaimovich, H., and Schreier, S. (1977) Spin label study of detergents in the region of critical micelle concentration, *Chem. Phys. Lipids* 18, 304-315.
42. Helenius, A, and Simons, K. (1975) Solubilization of membranes by detergents, *Biochim. Biophys. Acta* 415, 29-79.
43. Prado, A., Arrondo, J. L. R., Villena, A., Goñi, F. M., and Macarulla, J. M. (1983) Membrane-surfactant interactions. The effect of Triton X-100 on sarcoplasmic reticulum vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 733, 163-171.
44. Ruiz, M. B., Prado, A., Goñi, F. M., and Alonso, A. (1994) An assessment of the biochemical applications of the non-ionic surfactant hecameg, *Biochim. Biophys. Acta* 1193, 301-306.
45. Yu, J., Fischman, D. A., and Stock, T. L. (1973) Selective solubilization of proteins and phospholipids from red blood cell membranes by nonionic detergents. *J. Supramol. Struct.* 1, 233-248.
46. Paternostre, M.T., Roux, M., and Rigaud, J. (1988) Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. 1. solubilization of large unilamellar liposomes (prepared by reverse-phase evaporation) by Triton X-100, octyl glucoside, and sodium cholate, *Biochemistry* 27, 2668-2677.
47. Goñi, F. M., Urbaneja, M. A., Arrondo, J. L., Alonso, A., Durrani, A.A., Chapman, D. (1986) The interaction of phosphatidylcholine bilayers with Triton X-100, *Eur. J. Biochem.* 160, 659-65.

48. Chernitsky, E. A., and Senkovich, O. A. (1997) Erythrocyte hemolysis by detergents, *Membr. Cell. Biol.* 11, 475-485.
49. Perutz, M. F. (1964) The hemoglobin molecule, *Sci. Am.* 211, 64-76.
50. Kragh-Hansen, U., Le Maire, M., and Moller, J. V. (1998) The mechanism of detergent solubilization of liposomes and protein-containing membranes, *Biophys. J.* 75, 2932-2946.

Table 1: Order parameter, S, calculated for the spectra of 5-DSA incorporated in whole erythrocytes, supernatant, and pellet in the presence of increasing TTX-100 concentrations. The last column gives the values of S for pure TTX-100 solutions^a.

[TTX-100]	S	S	S	S
mM	Whole	Supernatant	Pellet	TTX-100
0.1	0.710	-- ^b	0.707	Nd ^c
0.2	0.700	-- ^b	0.699	Nd ^c
0.3	0.711	-- ^b	0.695	Nd ^c
0.4	0.689	-- ^b	0.695	Nd ^d
0.5	0.670	0.702	0.693	Nd ^d
0.6	0.667	0.691	0.681	Nd ^d
0.7	0.670	0.695	Nd ^e	Nd ^d
0.8	0.677	0.701	Nd ^e	0.482
0.9	0.671	0.689	Nd ^c	0.447
1.0	0.672	0.669	Nd ^c	0.449
1.2	0.667	0.650	Nd ^c	0.478
2.5	0.670	0.639	Nd ^c	0.448
3.2	0.614	0.619	Nd ^c	0.448
10.0	0.519	0.528	Nd ^c	0.466
25.0	0.498	0.498	Nd ^c	0.461
32.5	0.490	0.486	Nd ^c	0.458
50.0	0.472	0.479	Nd ^c	0.461

^a Experimental conditions as in Figure 3. ^bNot determined, because of high noise in the spectra due to the small amount of aggregates in the supernatant. ^cOnly the spectrum due to label free in solution was detected. ^dNot determined, see text. ^eSpectra were not obtained because the volumes of the remaining pellet fractions were too small.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1: Hemolytic effect of TTX-100 on human erythrocytes (40% Ht in 5 mM PBS buffer, pH 7.4, 22 °C) measured by hemoglobin (■) or inorganic phosphate (○) release in the supernatant.

FIGURE 2: EPR spectra of 5-DSA in erythrocyte membranes (40 % Ht), at increasing TTX-100 concentrations. Whole blood (left column), supernatant (central) and pellet (right column). N.D. = not determined (see text).

FIGURE 3: Relative hemolysis (◇) and order parameter of human erythrocyte membranes (40% Ht, in 5 mM PBS buffer, pH 7.4, 22 ± 2 °C) at increasing TTX-100 concentration. Whole erythrocyte suspension (■), supernatant (○). S values for 5-DSA spectra in pure TTX-100 solutions (▲) are also plotted.

FIGURE 4: EPR spectra of 5-DSA in PBS buffer (a) and in the presence of increasing TTX-100 concentrations (mM): 0.1 (b), 0.5 (c), 1.0 (d), 5.0 (e), 50.0 (f).

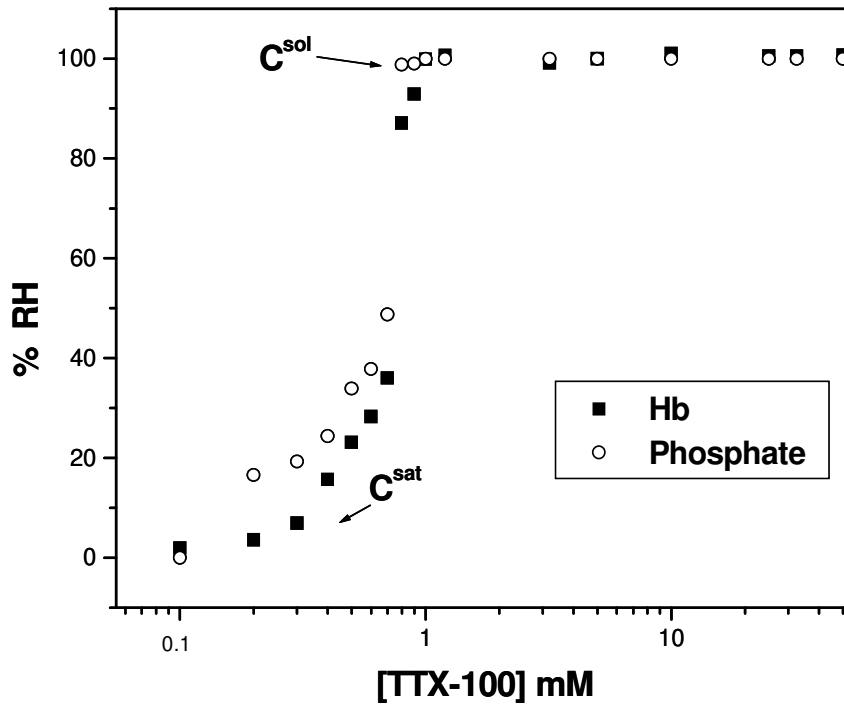


FIGURE 1

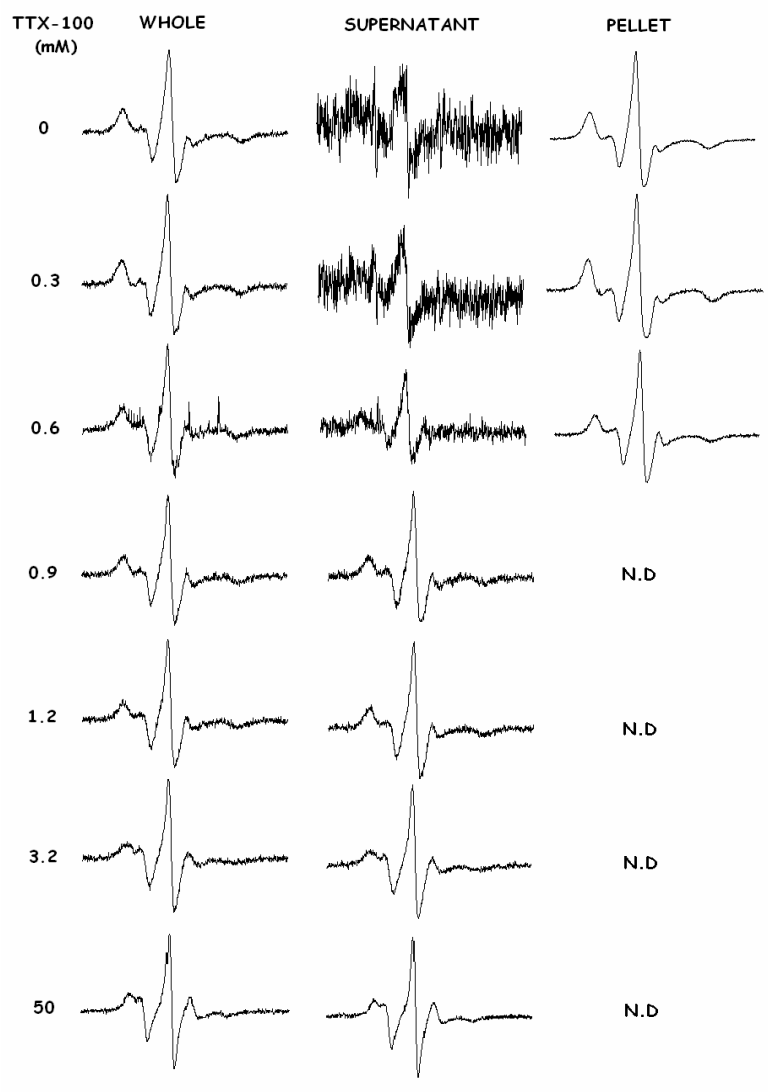


FIGURE 2

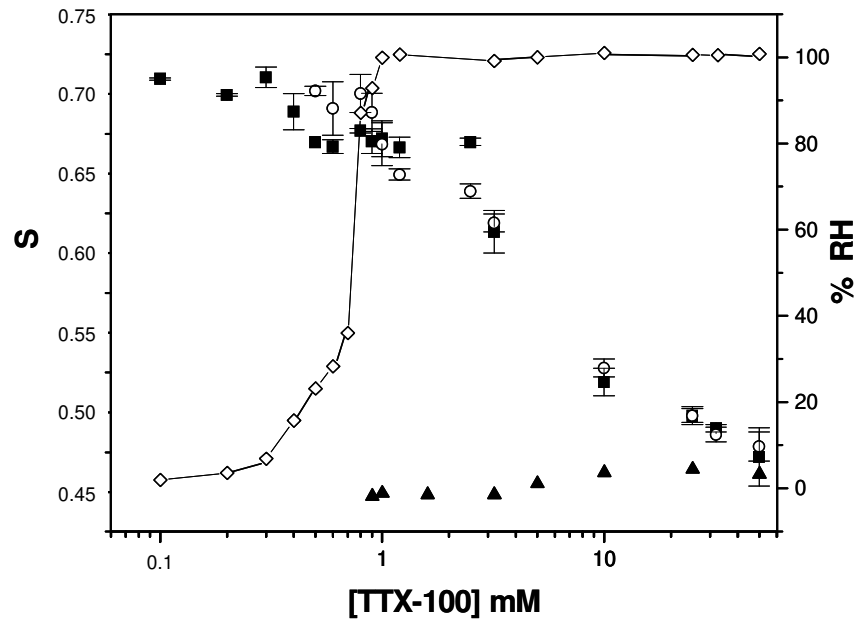


FIGURE 3

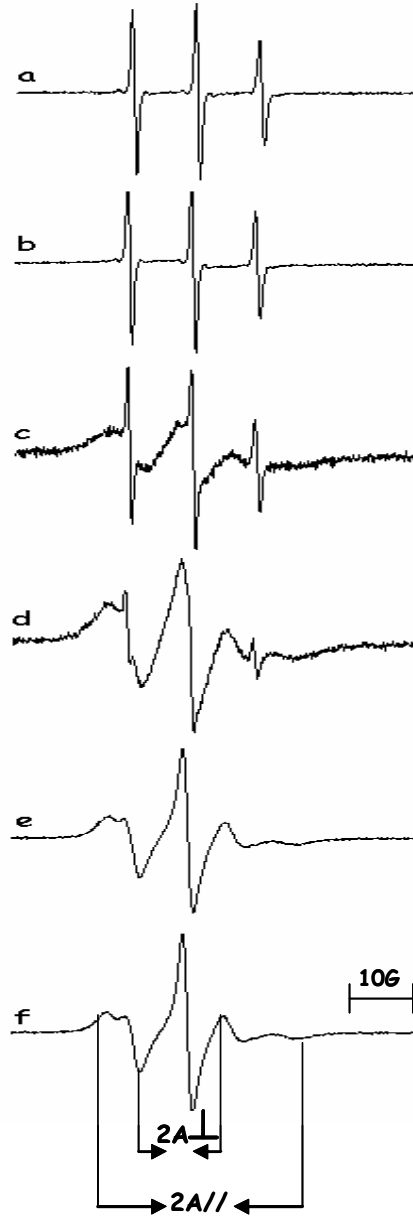


FIGURE 4

4.4 TESTES HEMOLÍTICOS EM CONDIÇÕES ISOTÔNICAS COM SURFATANTES NÃO IÔNICOS DA SÉRIE C₁₂E_Y, SÉRIE RENEX, SÉRIE TWEEN E SAIS BILIARES.

A figura 9 mostra o efeito do surfatante não iônico $C_{12}E_4$ e o tratamento de Lichtenberg (1985). Os testes hemolíticos com eritrócitos foram desenvolvidos em condições de osmolaridade e pH fisiológicos (PBS e pH 7,4). Nestes ensaios variou-se a concentração de eritrócitos (Ht-0,075%, 0,15%, 0,225%, 0,3%) determinando-se a concentração de surfatante para início (C^{sat}) e 100% de hemólise (C^{sol}). As tabelas 2 e 3 mostram os resultados obtidos com os outros detergentes estudados, sendo a porção apolar (cadeia acila) foi fixada em 12 carbonos e a porção polar (cabeça), foi variada, i.e., contendo de 2 a 23 unidades de polioxietileno.

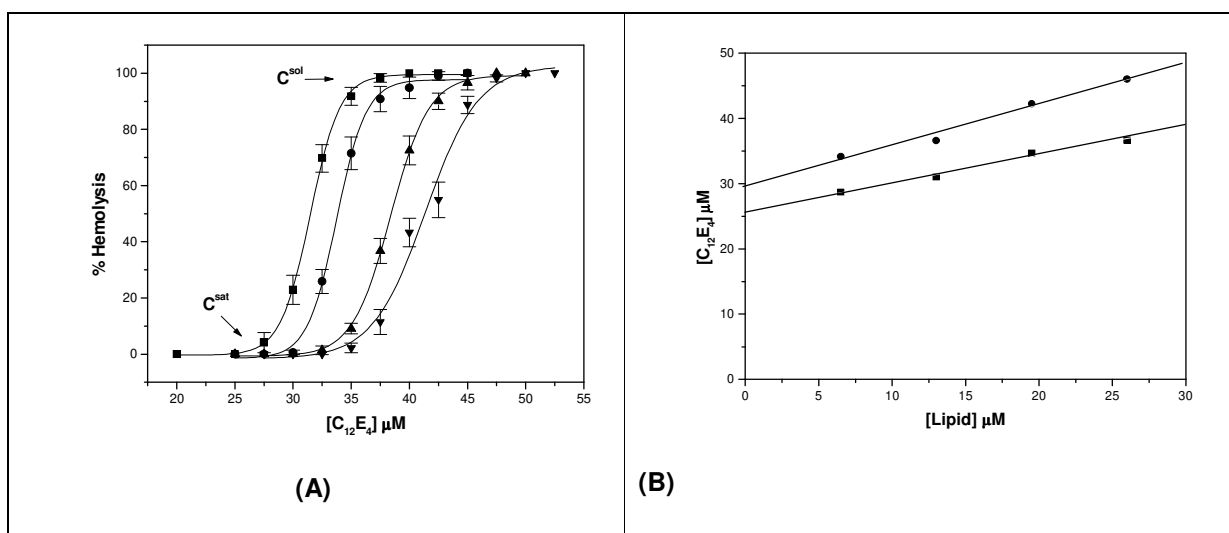


Figura 9: Efeito Hemolítico causado pelo detergente $C_{12}E_4$ em eritrócitos humanos - Ht 0,075%(■), 0,15% (●), 0,225% (▲) e 0,30% (▼) – em tampão PBS 5mM, pH 7,4, 37°C (a). C^{sat} e C^{sol} estão assinalados e indicam concentração para 0 e 100% hemólise, respectivamente. Concentração de $C_{12}E_4$ (Dt) para saturação e solubilização de membrana, versus concentração de lipídio na membrana (b). Os valores de R_e e K_b foram calculados das retas em (b), de acordo com Lichtenberg.

Ao contrário dos resultados obtidos com variação da cadeia acila (Preté *et al.*, 2002a), não foi possível definir um perfil para o efeito hemolítico, quando comparamos os análogos de cadeia acila fixa e cabeça polar de tamanho variável.

Tabela 2 - Efeito hemolítico dos surfatantes não-iônicos da série polioxietileno alquil éter ($C_{12}E_y$) em membranas de eritrócitos humanos. L = concentração de lipídio em membranas eritrocitárias para cada hematócrito, calculado de acordo com Malheiros et al. (2000a).

Surfatante	C^{sat} (μM)				C^{sol} (μM)			
	Ht-0,075 L= 6,5	Ht-0,15 L= 13	Ht-0,225 L=19,5	Ht-0,30 L= 26	Ht-0,075 L= 6,5	Ht-0,15 L= 13	Ht- 0,225 L=19,5	Ht-0,30 L= 26
$C_{12}E_2$	----	51,5	----	----	----	92,3	----	----
$C_{12}E_4$	28,7	31,0	34,6	36,7	34,2	36,6	42,2	46,0
$C_{12}E_5$	29,5	33,4	35,5	38,4	37,3	39,3	40,2	46,3
$C_{12}E_6$	31,3	34,4	36,0	40,1	35,0	36,9	40,6	44,3
$C_{12}E_8$	37,5	40,0	43,9	45,7	42,2	44,6	46,5	49,5
$C_{12}E_{10}$	17,4	20,8	23,3	27,5	22,8	24,9	28,6	30,0

Tabela 3 - Razão Molar Efetiva $C_{12}E_y$:lipídio (R_e), D_w^* dos detergentes $C_{12}E_y$, determinados nos experimentos hemolíticos, conforme tabela anterior.

	$C_{12}E_2$	$C_{12}E_4$	$C_{12}E_5$	$C_{12}E_6$	$C_{12}E_8$	$C_{12}E_{10}$
R_e^{sat}	nd	0,42	0,44	0,43	0,36	0,39
R_e^{sol}	nd	0,43	0,43	0,49	0,44	0,51
D_w^{sat} (μM)	nd	25,6	27,0	28,0	34,3	13,8
D_w^{sol} (μM)	nd	29,5	33,8	31,2	39,3	20,2
Kb (M^{-1})	nd	11600	11400	10700	6000	20400

O efeito hemolítico causado pelos análogos $C_{12}E_4$, $C_{12}E_5$, $C_{12}E_6$, $C_{12}E_8$ e $C_{12}E_{10}$ foi praticamente idêntico, como mostram os valores de R_e da tabela 3, evidenciando que para os homólogos com 4-10 unidades de polioxietileno, não há variação no poder hemolítico dos $C_{12}E_y$. Os resultados obtidos com o análogo $C_{12}E_2$ foram bastante distintos dos demais, em $Ht = 0,15\%$, observando-se que é necessário uma concentração quase 2 vezes maior deste detergente, para provocar o início e 100% de lise (C^{sat} e C^{sol} - Tabela 2).

A faixa de concentração para solubilização dos eritrócitos desta série está próxima da CMC dos mesmos.

O análogo C₁₂E₂₃ não se mostrou hemolítico, fato que pode ser explicado pelo efeito protetor exercido por cabeças polares constituídas de cadeias longas de polioxietileno.

A figura 10 mostra o efeito do surfatante não iônico da série nonilfenóis-Renex (60), em eritrócitos, condições de osmolaridade e pH fisiológicos (PBS em pH 7,4). Nestes ensaios variou-se ainda a concentração de eritrócitos (Ht-0,075%, 0,15%, 0,225%, 0,3%) para determinar a concentração de surfatante para início (C^{sat}) e 100% de hemólise (C^{sol}). É importante ressaltar que estudamos quatro surfatantes pertencentes a esta série, conforme dados apresentados nas tabelas 4 e 5.

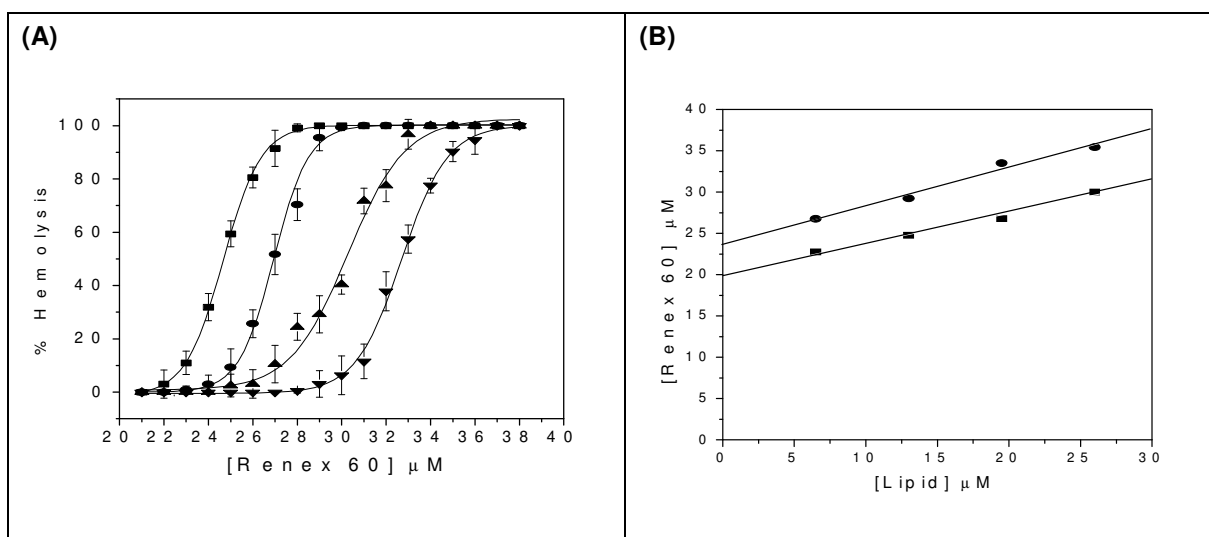


Figura 10 - Efeito Hemolítico do Renex 60 em eritrócitos humanos - Ht 0,075%(■), 0,15% (●), 0,225% (▲) e 0,30% (▼) – em tampão PBS 5mM, pH 7,4, 37°C (A). Concentração de Renex 60 (Dt) para saturação e solubilização de membrana, versus concentração de lipídio na membrana (B). Os valores de Re e Kb foram calculados conforme Lichtenberg em tampão PBS 5mM, pH 7,4, após 15 min. De incubação a 37°C.

Trabalhos anteriores de nosso laboratório mostraram que Renex com cabeças polares curtas, entre 6 e 10 unidades de polioxietileno (POE) são bons agentes hemolíticos, comparáveis ao TTX-100. No entanto, se aumentarmos as unidades de POE até 15 (Renex 150), notamos uma diminuição acentuada do efeito hemolítico (Galembeck *et al.*, 1998).

De fato, as cabeças polares grandes ou volumosas de POE de algumas séries de detergentes conferem a esses compostos um efeito protetor à hemólise. Nos detergentes da série Renex (nonilfenóis polietoxilados) de cadeia polioxietilenoglicol longas, a porção hidrofílica dessas moléculas - formadas por 10-100 unidades de PEG – funciona como uma barreira externa ao eritrócito, protegendo-o da hemólise (Galembeck *et al.*, 1998). Em outros ensaios hemolíticos, os resultados obtidos pelos autores evidenciaram que o Renex 95 (com 9,5 unidades de PEG) apresentava efeito lítico em meio isotônico, enquanto que os demais surfatantes da série (Renex 20 e 100 - com 20 e 100 resíduos etilenoglicol, respectivamente), não apresentam tal propriedade hemolítica. É interessante notar que essas moléculas têm capacidade de se incorporar à membrana, onde causam alteração na fluidez, como medido por ensaios de Ressonância Paramagnética Eletrônica (Galembeck *et al.*, 1998). Os autores ainda observaram que o Renex-1000 apresentava uma eficiente ação protetora contra a hemólise, devido à grande cadeia de polioxietileno (100 unidades), o que sugere a formação de uma “capa” hidrofílica ao redor do eritrócito. O alto HLB dessas moléculas também contribui para esse efeito protetor.

Os dados das tabelas 4 e 5 mostraram que os surfatantes utilizados apresentam propriedades líticas próximas as CMC dos mesmos. Os valores de R_e^{sol} (Tabela 5) mostrou que o Renex 60, 95 e 100 são muito parecidos, sendo o Renex 150 o que apresenta menor poder lítico, sendo classificado como fraco.

Tabela 4 - Efeito hemolítico dos surfatantes não-iônicos da séries Renex em membranas de eritrócitos humanos. L= concentração de lipídio em membranas eritrocitárias para cada hematócrito, calculado de acordo com Malheiros et al. (2000).

Surfatante	$C^{sat}(\mu M)$				$C^{sol}(\mu M)$			
	0,075 L (μM) 6,5	0,15 13	0,225 19,5	0,30 26	0,075 6,5	0,15 13	0,225 19,5	0,30 26
Renex 60	22,74	24,74	26,76	30,00	26,75	29,20	33,49	35,41
Renex 95	32,87	36,06	38,95	40,92	41,25	48,14	46,01	49,43
Renex 100	25,93	27,14	29,54	32,62	30,40	33,15	39,52	40,56
Renex 150	30,42	35,83	48,27	51,11	39,83	49,82	57,70	60,88

Tabela 5 - Razão Molar Efetiva detergente Renex/lipídio (R_e), D_w e constantes de ligação (K_b) determinados.

	Renex 60	Renex 95	Renex 100	Renex 150
CMC (M)	-----	$7,8-9,2 \times 10^{-5}$	$7,5-9,0 \times 10^{-5}$	$1,1-1,3 \times 10^{-4}$
$R_{e^{sat}}$	0,37	0,42	0,36	1,09
$R_{e^{sol}}$	0,46	0,42	0,53	1,15
$D_{W^{sat}}(\mu M)$	20,1	30,4	22,9	22,8
$D_{W^{sol}}(\mu M)$	23,66	38,11	27,18	34,3
$K_b (M^{-1})$	13300	7700	11400	23400

A figura 11 mostra o efeito do surfatante não iônicos da série polioxietileno-sorbitóis-Tween (40) em eritrócitos, condições de osmolaridade e pH, fisiológicos (PBS e pH 7,4). Nestes ensaios variou-se a concentração de eritrócitos (Ht-0,075%, 0,15%, 0,225%, 0,3%) e detectou-se a concentração de surfatante para início (C^{sat}) e 100% de hemólise (C^{sol}). Nesta série, o efeito lítico dos detergentes não iônicos derivados do polioxietileno-sorbitol, os Tweens 20, 40 e 80 foram estudados, conforme dados apresentados nas tabelas 6 e 7.

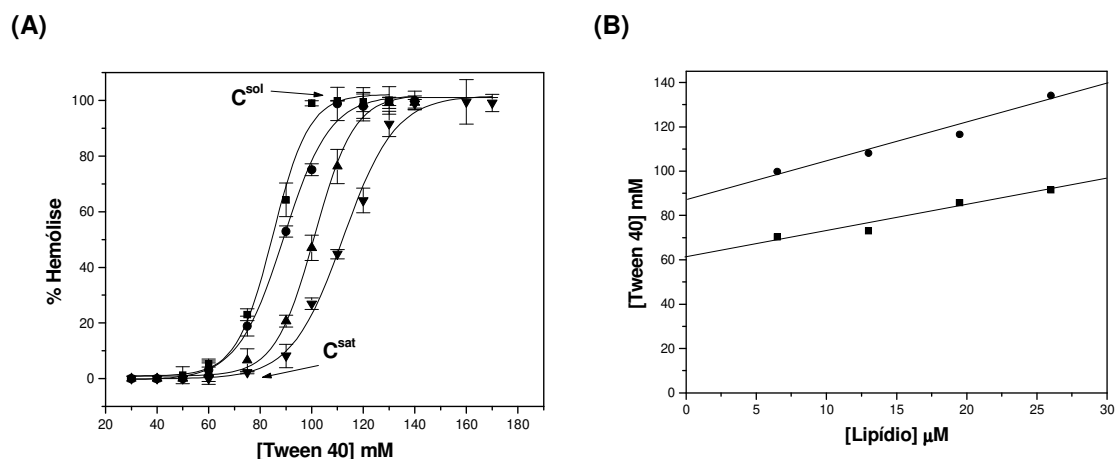


Figura 11 - Efeito Hemolítico do Tween 40 em eritrócitos humanos - Ht 0,075% (■), 0,15% (●), 0,225% (▲) e 0,30% (▼) – em tampão PBS 5mM, pH 7,4, 37°C (A). Concentração de Tween 40 (Dt) para saturação e solubilização de membrana, versus concentração de lipídio na membrana (B). Os valores de R_e e K_b foram calculados conforme Lichtenberg em tampão PBS 5mM, pH 7,4, após 15 min. De incubação a 37°C.

Tabela 6 - Efeito hemolítico dos surfactantes não-iônicos da série Tween em membranas de eritrócitos humanos. L= concentração de lipídio em membranas eritrocitárias para cada hematócrito, calculado de acordo com Malheiros et al. (2000).

Detergente	$C^{sat}(\mu M)$				$C^{sol}(\mu M)$			
	Ht (%)	Ht (%)	Ht (%)	Ht (%)	Ht (%)	Ht (%)	Ht (%)	Ht (%)
	0,075	0,15	0,225	0,30	0,075	0,15	0,225	0,30
L (μM)	6,5	13	19,5	26	6,5	13	19,5	26
Tween 20	1,98	2,39	2,58	2,64	5,9	8,2	10,2	12,4
Tween 40	70,23	72,98	85,74	91,38	99,8	108,0	116,5	134,1
Tween 80	118,93	150,97	160,39	167,29	165,3	186,2	202,7	220,0

Tabela 7 - Razão Molar Efetiva Tween/lipídio (R_e), D_w e constante de ligação (K_b) dos detergentes, determinados nos experimentos hemolíticos, conforme equação 1.

	Tween 20	Tween 40	Tween 80
$R_{e\ sat}$	33,4	1172,5	2364,9
$R_{e\ sol}$	329,1	1713,5	2779,7
$D_{w\ sat}(mM)$	1,9	6,1	110
$D_{w\ sol}(mM)$	2,1	6,6	121
$K_b (M^{-1})$	522	16	9

Os dados das tabelas 6 e 7 mostram que o efeito lítico dos surfatantes Tweens 20, 40 e 80 é inversamente proporcional à hidrofobicidade destes, o que deve ser explicado pelo alto HLB desta série, sendo que estes detergentes estão numa escala de 75% do balanço hidrofílico/lipofílico proposto por Griffin (1949). Portanto, são muito mais hidrofílicos que o TTX-100, mas possuem um potencial lítico bem inferior a este surfatante, isto se deve provavelmente ao fato de que a porção hidrofílica dos Tweens é composta por 3 cabeças polares. Como particularidade dos Tweens, notamos que sua faixa de concentração para solubilização dos eritrócitos está bem acima dos valores de CMC, ao contrário do que acontece com o TTX-100 e outros detergentes.

É possível, nas micelas de Tween, que as 3 cadeias de polioxietileno (porção hidrofílica) funcionem como uma “barreira” estérica, diminuindo a velocidade de troca monômeros/bicamada. Assim, o efeito hemolítico dos Tweens só é observado em razões molares extremamente altas, a exemplo do observado com surfatantes da série Renex, de cadeia de PEG longas (Galembeck *et al.*, 1998). Quando a hemólise não está associada com a agregação do surfatante, como no caso do anestésico local dibucaína, que provoca hemólise em concentrações inferiores a sua CMC (Malheiros *et al.*, 2000), o tratamento de Lichtenberg pode não ser adequado para descrever a solubilização da membrana.

Conclui-se então que, dentro da série dos Tweens e com hematócritos baixos (0,075, 0,15, 0,225 e 0,30%) os análogos Tween 20, 40 e 80 têm efeito lítico acima das suas CMC (59, 27 e 12 μ M, respectivamente), enquanto que para o TTX-100 a solubilização é encontrada na faixa da CMC. A potência lítica tem o perfil: Tween 20 > Tween 40 > Tween 80, o que está de acordo com os trabalhos de literatura, que mostram o uso do Tween 20 como solubilizante da membrana, e não de seus análogos mais hidrofóbicos (40, 60 e 80) (Wong *et al.*, 1987; Cho *et al.*, 2000).

O tratamento de Lichtenberg não se aplica na análise do efeito hemolítico dos surfatantes da série Tween, pois os valores de R_e (razão molar efetiva surfactante/lipídio) são muito altos e a hemólise ocorre em concentrações superiores a da CMC, sugerindo que a presença de micela não é o fator determinante da lise,

base do modelo de solubilização proposto por Lichtenberg (2000). É importante ressaltar que esta série apresenta HLB muito alto.

Concluimos assim que os surfatantes da série Tween são fracos agentes hemolíticos (em relação a surfatantes não-iônicos como o TTX-100), o que deve ser resultante da alta HLB desses detergentes, já que as 20 unidades de polioxidoetileno dificultam a troca entre monômeros/lipídios de membrana levando à estabilização da membrana.

A figura 12 mostra o efeito do sal biliar Litocolato em eritrócitos, condições de osmolaridade e pH fisiológicos (PBS e pH 7,4). Nestes ensaios variou-se ainda a concentração de eritrócitos (Ht-0,075%, 0,15%, 0,225%, 0,3%) para determinar a concentração de sal biliar para início (C^{sat}) e 100% de hemólise (C^{sol}). É importante ressaltar que foram estudados os sais biliares: Desoxicolato, Litocolato, Ursodesoxicolato, Glicocolato, Glicodesoxicolato, Taurocolato, Taurodesoxicolato, conforme dados apresentados nas tabelas 8 e 9.

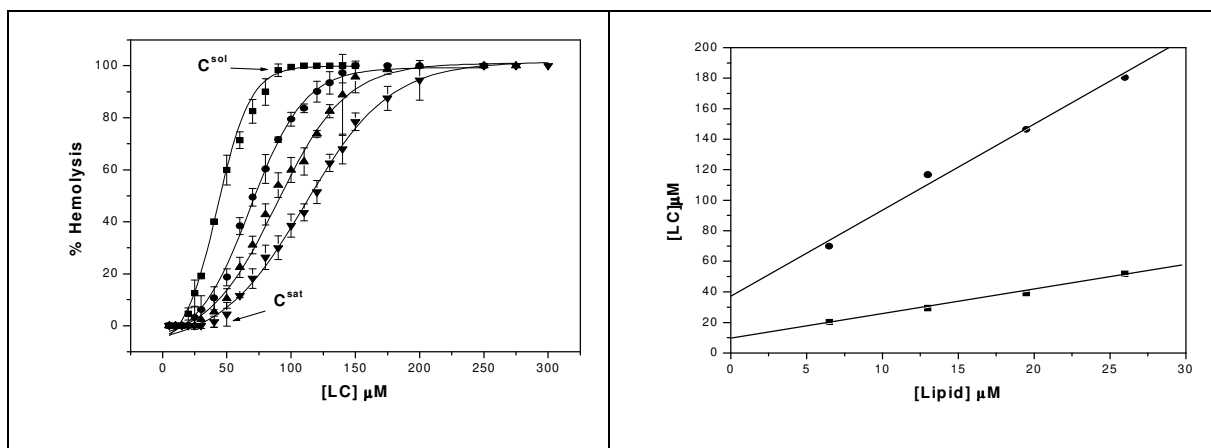


Figura 12 - Efeito Hemolítico causado por Litocolato (LC) em eritrócitos humanos - Ht 0,075% (■), 0,15% (●), 0,225% (▲) e 0,30% (▼) – em tampão PBS 5mM, pH 7,4, 37°C (A). Concentração de Litocolato (Dt) para saturação e solubilização de membrana, versus concentração de lipídio na membrana (B). Os valores de R_e e K_b foram calculados, conforme Lichtenberg em tampão PBS 5mM, pH 7,4, após 15 min. de incubação a 37°C.

Tabela 8 - Efeito hemolítico de Sais Biliares em membranas de eritrócitos humanos. L= concentração de lipídio em membranas eritrocitárias para cada hematócrito, calculado de acordo com Malheiros et al. (2000).

Sal Biliar	$C^{sat}(\mu M)$				$C^{sol}(\mu M)$			
	0,075 6,5	0,15 13	0,225 19,5	0,30 26	0,075 6,5	0,15 13	0,225 19,5	0,30 26
C	1838	2159	2400	2716	2159	2405	2809	3154
DC	809	899	988	1090	1001	1063	1134	1206
LC *	20	29	39	52	70	117	146	180
GDC	673	804	885	955	894	1016	1156	1215
TDC	1072	1082	1098	1115	1192	1215	1248	1260

* LC e UDC foram solubilizados em DMSO 5%. Nd = não houve hemólise

Sais Biliares não são surfatantes de alto poder hemolítico, pois as razões molares Sal Biliar/Lipídio para hemólise (R_e) da tabela 2 são altas em relação a outras séries estudadas. As concentrações para hemólise estão próximas as cmcs dos mesmos.

Além disso, dentro da série estudada R_e^{sol} mostrou o seguinte perfil: LC < DC < GDC < TDC < C, enquanto GC, TC e UDC - até 10 mM – não apresentaram atividade hemolítica. A abstração do grupo hidroxila nas posições 7 ou 12 torna os sais biliares mais hemolíticos que suas contrapartes (DC > C, LC > UDC, GDC > GC e TDC > TC). Além disso, há uma relação direta entre o tamanho do substituinte na posição 24 (COO⁻ < glicina < taurina) e os valores de R_e , mostrando que a conjugação hepática dos sais biliares primários e secundários, diminui seu efeito hemolítico. Este dado é interessante se lembrarmos que a conjugação hepática faz aumentar significativamente o balanço hidrofílico-lipofílico do sais, explicando a variação no efeito hemolítico observado.

Tabela 9 - Razão Molar Efetiva Sal Biliar/lípido (R_e), D_w e constantes de ligação (K_b) dos Sais Biliares, determinados nos experimentos hemolíticos.

	C	DC	LC	GDC	TDC
R_e^{sat}	44,2	10,6	1,6	14,3	22,3
R_e^{sol}	52,1	14,3	5,6	17,0	36,5
$D_w^{sat}(\mu M)$	1559,5	713,5	8,9	597,5	1056
$K_b (M^{-1})$	630	1310	69310	1560	650

Nd = não houve hemólise

Os resultados obtidos mostraram haver uma direta correlação entre o substituinte negativamente carregado na posição R3 ($COO^- < \text{glicina} < \text{taurina}$) e os valores de R_e^{sat} , mostrando que a conjugação dos sais biliares diminui seu efeito hemolítico. No entanto, compostos menos hidrofóbicos como o taurocolato, o glicocolato e o ursodesoxicolato não registraram efeito lítico, nas concentrações testadas (até o limite de sua solubilidade aquosa).

A tabela 10 resume os resultados de R_e^{sat} obtidos com todos os surfatantes estudados, além de algumas propriedades físico-químicas como: CMC, HLB e também sua classificação como agentes FRACOS ou FORTES solubizadores, de acordo com o critério difundido por Heerklotz & Sellig (2000).

A existência de uma íntima correlação entre formação de micela, partição e ruptura da membrana tem sido descrita na literatura (Lichtenberg, 1985; Lichtenberg *et al.*, 2000). Desta forma, o produto de $K_b \cdot CMC$ foi proposto para classificar os surfatantes em relação ao potencial de ruptura de membrana (Heerklotz & Seelig, 2000a), ou seja, surfatantes com $K_b \cdot CMC < 1$ são considerados fortes enquanto aqueles que apresentam $K_b \cdot CMC > 1$ são considerados fracos.

Tabela 10 - Classificação dos surfatantes estudados, conforme Heerklotz & Seelig (2000a), pela relação entre as constantes de ligação (K_b) dos detergentes nas membranas eritrocitárias e seus valores de CMC.

Surfatante	CMC (M)	K_b (M) _a	HLB	$K_b \times$ CMC	Re^{sat}	Classificação ^c
C₁₀E₈	$9,7 \times 10^{-4}$	2400	14,5	2,3	2,23	FRACO
C₁₂E₈	$8,8 \times 10^{-5}$	6000	13,7	0,5	0,21	FORTE
C₁₄E₈	$8,0 \times 10^{-6}$	25500	13,0	0,2	0,13	FORTE
C₁₆E₈	$7,3 \times 10^{-7}$	31500	12,4	0,0	0,05	FORTE
C₁₈E₈	$5,9 \times 10^{-8}$	47700	11,9	0,0	0,03	FORTE
C₁₂E₄	$6,5 \times 10^{-5}$	11600	9,8	0,8	0,42	FORTE
C₁₂E₅	$6,2 \times 10^{-5}$	11400	10,9	0,7	0,44	FORTE
C₁₂E₆	$6,7 \times 10^{-5}$	10700	11,8	0,7	0,43	FORTE
C₁₂E₁₀	$0,9 \times 10^{-5}$	20400	14,1	1,8	0,39	FRACO
Colato	$6,5 \times 10^{-3}$	630	1,6 ^b	4,1	44,2	FRACO
Desoxicolato	$2,5 \times 10^{-3}$	1310	1,6 ^b	3,3	14,3	FRACO
Litolato	---	69310	1,7 ^b		1,6	FRACO
Ursodesoxicolato	$7,0 \times 10^{-3}$	Nd	0,8 ^b		-	
Glicocolato	$7,0 \times 10^{-3}$	Nd	4,4 ^b		-	
Glicodesoxicolato	$1,1 \times 10^{-3}$	1560	3,8 ^b	1,7	14,3	FRACO
Taurocolato	$4,5 \times 10^{-3}$	Nd	5,8 ^b		-	
Taurodesoxicolato	$1,5 \times 10^{-3}$	650	5,4 ^b	1,0	22,3	FRACO
Renex 60	-	13300	10,9		0,37	FORTE
Renex 95	$7,8-9,2 \times 10^{-5}$	7700	13,0	0,7	0,42	FORTE
Renex 100	$7,5-9,0 \times 10^{-5}$	11400	13,3	0,9	0,36	FORTE
Renex 150	$1,1-1,3 \times 10^{-4}$	23400	15,0	2,8	1,15	FRACO
Tween 20	$5,9 \times 10^{-5}$	522	16,7	0,03	33,4	FRACO
Tween 40	$2,7 \times 10^{-5}$	16,4	15,6	0,0	1172	FRACO
Tween 80	$1,2 \times 10^{-5}$	9,0	15,0	0,0	2365	FRACO
Triton X-100	$2,5 \times 10^{-4}$	5900	13,5	1,5	1,58	FRACO
ASB 14	$1,1 \times 10^{-4}$	7047	11,6	0,8	0,22	FORTE
ASB 16	$1,4 \times 10^{-5}$	15609	10,9	0,2	0,08	FORTE

^a Valor de K_b^{sat} e Re obtidos neste projeto; ^b Calculado de acordo com Griffin [1949]; ^c Classificação de acordo com Heerklotz & Seelig (2000).

Dentre os detergentes por nós estudados, razões $K_b \cdot CMC$ menores que 1 foram encontradas para detergentes da série Renex com cabeça polar pequena (i.e. homólogos com < 10 unidade de polietilenoglicol, POE) e todos os CxEy com cadeia acila maior que 12 carbonos, refletindo seu forte potencial na solubilização de membranas. Razões de $K_b \cdot CMC$ maiores que 1 foram encontradas para os sais

biliaries, Tweens (que possuem 3 cadeias de POE), para o Renex de cabeça polar grande (Renex 150) e para os CxEy de cadeia acila curta (C₁₀E₈) para o Triton X-100. Assim, de acordo com Heerklotz & Seelig (2000) estes surfatantes seriam classificados como fracos solubilizadores. Portanto, pode-se propor como alternativa a análise dos valores de razão molar para solubilização da membrana, Re^{sat} (Tabela 10, penúltima coluna) para classificação destes detergentes, tendo encontrado uma boa correlação entre a razão detergente:lipídio para início da lise, Re^{sat} (sendo $Re^{sat} < 1$ = forte; $Re^{sat} > 1$ = fraco) e a classificação dos detergentes pelo produto de $K_b \cdot CMC$, proposta por Heerklotz & Seelig (2000), para a maior parte (20 dos 24 detergentes listados). Assim, a Tabela 10, mostra uma nova forma de classificar os detergentes, de acordo com seu efeito lítico.

Pelo parâmetro de Re^{sat} pudemos classificar 2 surfatantes (Litocolato e Renex 60), antes não classificados pelo parâmetro de $K_b \cdot CMC$, como fraco e forte, respectivamente. Assim, os valores de Re^{sat} podem ser utilizados como alternativa para classificação de detergentes cujos valores de CMC sejam de difícil determinação ou extremos (muito grandes ou muito pequenos), inviabilizando a compensação por K_b , numa clara demonstração da limitação do parâmetro proposto por Heerklotz & Seelig (2000).

Sendo que: 1) os ensaios hemolíticos são reconhecidos como bons modelos da interação entre anfífilos e membranas (Malheiros et al, 2004 e referências ali citadas); 2), onde os valores de Re^{sat} descrevem adequadamente, no nível molecular, a concentração de detergente na bicamada – em relação aos lipídios de membrana, capaz de levar à ruptura da membrana e 3) que as medidas de Re^{sat} são feitas em membranas biológicas e não em sistemas modelo, como na maior parte dos trabalhos de determinação de K_b ; concluímos ser este o melhor parâmetro para descrever a ação de surfatantes em membranas.

5 CONCLUSÕES

I. Efeito lítico de diferentes séries de surfatantes:

O tratamento quantitativo proposto por Lichtenberg foi aplicado para estudo da lise de eritrócitos, induzida por vinte e seis compostos, pertencentes a cinco diferentes séries de surfatantes com bastante sucesso.

Dentro das séries estudadas encontramos alguns análogos como os C_xE_y e Renex que possuem efeito lítico mais pronunciado que o TTX-100, classicamente usado para solubilização de membranas.

De uma maneira geral, dentro de cada série o efeito lítico é diretamente proporcional ao aumento da porção hidrofóbica da molécula, enquanto que o aumento da cabeça polar contribui de maneira oposta, i.e., diminuindo ou eliminando o efeito lítico.

Com exceção dos detergentes da série Tween (HLB muito alto) as concentrações hemolíticas eram próximas as CMC dos surfatantes.

II. Classificação do efeito lítico dos detergentes usando os valores de R_e

A abordagem quantitativa adotada para tratamento da hemólise de eritrócitos humanos, aplicada neste trabalho, permitiu comparar o efeito lítico de diferentes séries de surfatantes clássicos e classificá-los como fracos ou fortes agentes solubilizadores, usando os valores de R_e . Neste estudo, com 26 surfatantes pertencentes a cinco diferentes séries, foi encontrada uma correlação de 100% entre a classificação pelos valores de R_e e por outro parâmetro descrito na literatura, $K_b \times CMC$, este último empregado para explicar o efeito solubilizante em membranas lipídicas (Heerklotz & Seelig, 2000a).

Desta forma, demonstrou-se que a razão molar surfatante:lipídio (R_e) para solubilização da membrana, proposta por Lichtenberg pode ser usada para avaliação do efeito lítico de detergentes em membranas biológicas, permitindo a classificação de um número maior de compostos em relação a seu efeito lítico em sistemas membranares complexos, contendo lipídios e proteínas.

III. Evidências da transição membrana-micela durante a hemólise ou solubilização da membrana.

Através da técnica de EPR, foi possível acompanhar o parâmetro de ordem do marcador de spin 5 ácido doxil estearato incorporado nas membranas determinando-se a transição membrana - membrana mista - micela mista, ao mesmo tempo que a liberação de hemoglobina e fosfato eram observados após a exposição de hemáceas ao detergente não iônico Triton X100.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adamo, H. P., Grimaldi, M., E., Bredston, L. M. (2000). The N-terminal region of the plasma membrane Ca^{2+} pump does not separate from the main catalytic fragments after proteolysis. **Biochim. Biophys. Acta** **1464**:127-134.
- Ahmed, S. N., Brown, D. A., London, E. (1997). On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes. **Biochemistry**. **36**: 10944-10953.
- Attwood, D., Florence, A. T. (1983). **Surfactant Systems-Their Chemistry, Pharmacy and Biology**, 2^a ed, N.Y.London. Chapman and Hall.
- Bachofer, S. J. (1996). Conductivity, a simple method to probe micellar solutions. **J. Chem. Educ.** **73**:861-864.
- Banghan, J. A., Lea, E. J. A. (1978). The interaction of detergents with bilayer lipid membranes. **Biochim. Biophys. Acta** **511**:388-396.
- Basheer, S., Mogi, K., Nakajima, M. (1995). Surfactant-modified lipase for the catalysis of the interesterification of triglycerides and fatty-acids. **Biotechnol. Bioeng.** **45**:187-195.
- Bassetti, L., Hagendoorn, M., Tramper, J. (1995). Surfactant-induced non-lethal release of anthraquinones from suspension cultures of morinda citrifolia. **J. Biotechnol.** **39**:149-155.
- Baynes, J., Dominiczack, M. H. (2000). **Bioquímica Médica**. 1^a ed., Editora Manole, São Paulo.
- Begona, R. M., Prado, A., Goñi, F. M., Alonso, A. (1994). An assessment of the biochemical applications of the non-ionic surfactant Hecameg. **Biochim. Biophys. Acta** **1193**:301-306.
- Benet, L. Z., Kroetz, D. L., Sheiner, L. B. (1996). Farmacocinética. A dinâmica da absorção, distribuição e eliminação dos fármacos, em **As bases farmacológicas da terapêutica**, 9th ed, Mc Graw-Hill, Santiago de Chile, 3-21.
- Berg, M. J., Tymoczko, J. L., Stryer, L. (2004). **Bioquímica**. 5^a ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Berthod, A., Tomer, S., Dorsey, J. G. (2001). Polyoxyethylene alkyl ether nonionic surfactants: physicochemical properties and user for cholesterol determination in food. **Talanta**. **55**:69-83.
- Bhairi, S. M. (2001). **Detergents – A Guide to the Properties and Uses of Detergents in Biological Systems**. Calbiochem-Novabiochem Corporation. La Jolla.
- Bielawski, J. (1989). Two types of haemolytic activity of detergents. **Biochim. Biophys. Acta** **1035**: 214-217.
- Bielawski, J., Mrówczyńska L., Konarczak, M. (1995). Hemolytic activity of the non-ionic detergents Tween 80 and Triton X-100. **Biol. Bull. Poznan** **32**: 27-41.
- Bogner, P., Wheatley, D. N., Borbély, C., Miseta, A. (1996). Albumin can reverse the release of potassium from human erythrocytes treated with the non-ionic detergent, Brij 58. **Cell. Biol. Int.** **11**:741-749.

- Braun, K. R., Davidson, K. M., Henry, M., Nielsen, H. C. (1999). Severe pulmonary hemorrhage in the premature newborn infant: Analysis of presurfactant and surfactant. **Biol. Neonate.** **75**:18-30.
- Brenner, C., Jan, G., Chevalier, Y., Wroblewski, H. (1995). Evaluation of the efficacy of zwitterionic dodecyl carboxybetaine surfactants for the extraction and the separation of mycoplasma membrane protein antigens. **Anal. Biochem.** **224**: 515-523.
- Brito, A., Silva, R. M., Matos, D. C., Silva A. T., Brites, D. (1996). Alterations of erythrocyte morphology and lipid composition by hyperbilirubinemia. **Clin. Chim. Acta** **249**:149-165.
- Brown, D. A., London, E. (1998b). Functions of lipid rafts in biological membranes. **Annu Rev. Cell. Dev. Biol.** **14**:111-136.
- Brown, D.A. London E. (1998a). Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. **J. Membr. Biol.** **164**:103-114.
- Bull, B. S., Breton-Gorius, J., Beutler, E. (1990). Morphology of the erythron, **In Hematology**, 4th ed, Mc Graq-Hill, New York, 297-316.
- Carafa, M., Lucania, G., Marchei, E., Dolo, V., Giammatteo, M., Torrisi, M. R., Santucci, E., Pavan, E. (1999). Morphological analysis of the interaction of charged surfactant vesicles (SVs) with human cultured cells. **Biotech. Histochem.** **74**:77-84.
- Castro, V. R. O., Ashwood, E. R., Wood, S. G., Vernon, L. P. (1990). Hemolysis of erythrocytes and fluorescence polarization changes elicited by peptide toxins, aliphatic alcohols, related glycols and benzylidene derivatives. **Biochim. Biophys. Acta** **1029**:252-258.
- Chernitsky, E. A., Senkovich, O. A. (1997). Erythrocyte hemolysis by detergents. **Membr. Cell. Biol.** **11**:475-85.
- Chevallet, M., Sabtoni, V., Poinas, A., Rouquié, D., Fuchs, A., Kieffer, S., Rossignol, M., Lunardi, J., Garin, J., Rabilloud, T. (1998). New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis** **19**:1901-1909.
- Chi, L. M., Wu, W. G. (1991). Mechanism of hemolysis of red blood cell mediated by ethanol. **Biochim. Biophys. Acta** **1062**:46-50.
- Cho, J. K., Azuma, N., Lee, C. H., Yu, J. H., Kanno, C. (2000). Purification of membrane-bound lactoferrin from the human milk fat globule membrane. **Biosc. Biotechnol. Biochem.** **64**:633-635.
- Chung, J. E., Yokoyama, M., Yamato, M., Aoyagi, T., Sakurai, Y., Okano, T. (1999). Thermo-responsive drug delivery from polymeric micelles constructed using block copolymers of poly(N-isopropylacrylamide) and poly(butylmethacrylate). **J. Control. Rel.** **62**:115-127.
- Clothier, J. G., Tomellini, S. A. (1996). Chiral separation of verapamil and related compounds using micellar electrokinetic capillary chromatography with mixed micelles of bile salt and polyoxyethylene ethers. **J. Chromatog. A.** **723**:179-187.
- Cohen, G., Hochstein, P. (1964). Generation of hydrogen peroxide in erythrocytes by hemolytic agents. **Biochemistry** **35**:895-900.
- Connor, J., Gillum, K., Schroit, A. J. (1990). Maintenance of lipid asymmetry in red blood cells and ghosts: effect of divalent cations and serum albumin on the

transbilayer distribution of phosphatidylserine. **Biochim. Biophys. Acta** **1025**: 82-86.

- Cummins, T. J., Ekeze, T. (1997). Methods of extracting deoxyribonucleic acids without using a proteolytic enzyme. **Biotechnol. Adv.** **15**:389-393.
- Daum, G. (1985). Lipids of mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta** **822**:1-42.
- de Paula, E., Schreier, S. (1995). Use of a novel method for determination of partition coefficients to compare the effect of local anesthetics on membrane structure. **Biochim. Biophys. Acta** **1240**:25-33.
- Devaux, P. F. (1991). Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. **Biochemistry** **30**:1163-1173.
- Domingues, C. C. (2004). **Avaliação da Solubilização de membranas eritrocitárias e suas proteínas por novos surfatantes zwitteriônicos**. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas.
- Dominguez, A., Fernandez, A., Gonzalez, N., Iglesias, E., Montenegro, L. (1997). Determination of critical micelle concentration of some surfactants by three techniques. **J. Chem. Educ.** **74**:1227-1231.
- Edwards, K., Almgreen, M. (1990). Kinetics of surfactant-induced leakage and growth of unilamellar vesicles. **Progr. Coll. & Polymer Sci.** **82**:190-197.
- Ernandes, J. R., Chaimovich, H., Schreier, S. (1977). Spin label study of detergents in the region of critical micelle concentration. **Chem. Phys. Lipids.** **18**:304-315.
- Esmann, M., Skou, J. C. (1984). Kinetic properties of C₁₂E₈ solubilized (Na⁺ + K⁺)-ATPase. **Biochim. Biophys. Acta** **787**:71-80.
- Eubel, H., Heinemeyer, J., Sunderhaus, S., Braun, H. P. (2004). Respiratory chain supercomplexes in plant mitochondria. **Plant Physiol. Biochem.** **42**:937-942.
- Faivre, B., Menu, P., Labrude, P., Vigneron, C. (1998). Hemoglobin autooxidation/oxidation mechanisms and methemoglobin prevention or reduction processes in the bloodstream - Literature review and outline of autooxidation reaction. **Artif. Cell. Blood Sub.** **26**:17-26.
- Forney, C. E., Glatz, C. E. (1995). Extraction of charged fusion proteins in reversed micelles: Comparison between different surfactant systems. **Biotechnol. Prog.** **11**:260-264.
- Galembeck, E., Alonso, A., Meirelles, N. C. (1998). Effects of polyoxyethylene chain length on erythrocyte hemolysis induced by poly[oxyethylene (n) nonyphenol] non-ionic surfactants. **Chem. Biol. Inter.** **113**:91-103.
- Glover, R. E., Smith, R. R., Jones, M. V., Jackson, S. K., Rowlands, C. C. (1999). An EPR investigation of surfactant action on bacterial membranes. **FEMS Microbiol. Lett.** **177**:57-62.
- Gloxhuber, C. (1980). **Anionic Surfactants-Biochemistry, Toxicology, Dermatology**. Marcel Dekker, New York, vol. **10**.
- Gohon, Y., Popot, J. L. (2003). Membrane protein surfactant complexes. **Curr. Opin. Colloid Interface Sci.** **8**:15-22.
- Goldberg, B., Sterm, A. (1976). Superoxide anion as a mediator of drug-induced oxidative hemolysis. **J. Biol. Chem.** **251**:6468-6470.

- Goñi, F. M., Urbaneja, M. A., Arrondo, J. L., Alonso, A., Durrani, A.A., Chapman, D. (1986) The interaction of phosphatidylcholine bilayers with Triton X-100. **Eur. J. Biochem.** **160**: 659-65.
- Griffin, W. C. (1949). Classification of surface-active agents by HLB. **J. Soc. Cosmet. Chem.** **1**:311-319.
- Hägerstrand, H., Isomaa, B. (1989). Vesiculation induced by amphiphiles in erythrocytes. **Biochim. Biophys. Acta** **982**:179-186.
- Hägerstrand, H., Isomaa, B. (1991). Amphiphile induced antihaemolysis is not causally related to shape changes and vesiculation. **Chem. Biol. Inter.** **79**:335-347.
- Harano, T., Yamaguchi, T., Kimoto, E. (1994). Hemolytic properties of CA²⁺ treated human erythrocytes under hydrostatic pressure. **J. Biochem.** **116**:773-777.
- Heerklotz, H. (2002). Triton promotes domain formation in lipid raft mixtures. **Biophys. J.** **83**:2693-2701.
- Heerklotz, H., Seelig, J. (2000). Correlation of membrane/water partition coefficients of detergents with the critical micelle concentration. **Biophys. J.** **78**:2435-2440.
- Helenius, A., Simons, K. (1975). Solubilization of membranes by detergents. **Biochim. Biophys. Acta** **415**: 29-80.
- Henningsen, R., Gale, B.L., Straub, K.M., DeNagel, D.C. (2002). Application of zwitterionic detergents to the solubilization of integral membrane proteins for two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. **Proteomics** **2**: 1479-1488.
- Hiol, A., Jonzo, M. D., Druet, D., Comeau, L. (1999). Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis* f. **Enz. Microb. Tech.** **25**:80-87.
- Hollan, S. (1996). Membrane fluidity of blood cells. **Haematologia** **27**:109-127.
- Huang, S. Y., Lee, Y. C. (1994). Separation and purification of horseradish peroxidase from *Armoracia rusticana* root using reversed micellar extraction. **Biosep.** **4**:1-5.
- Hubbel, W. L., McConnel, H. M. (1971). Molecular motion in spin-labeled phospholipids and membranes. **J. Am. Chem. Soc.** **93**:314-326.
- Ikonen, E. (2001). Roles of lipid rafts in membrane transport. **Curr. Opin. Cell. Biol.** **13**:470-477.
- Irie, T., Uekama, K. (1997). Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 3. Toxicological issues and safety evaluation. **J. Pharm. Sci.** **86**:147-162.
- Isomaa, D., Hägerstrand, H., Paatero, G., Engblom, A. C. (1986). Permeability alterations and antihaemolysis induced by amphiphiles in human erythrocyte. **Biochim. Biophys. Acta** **860**:510-524.
- Israelachvili, J. N. (1985). **Intermolecular and surface forces with applications to colloidal and biological systems**. New York, Academic. Press.
- Jain, S. K. (1988). Evidence for membrane lipid peroxidation during the in vivo aging of human erythrocytes. **Biochim. Biophys. Acta** **937**:205-210.

- Janetzko, K., Schlenke, P., Kluter, H. (1999). The flow rate significantly influences the leukocyte depletion rate during prestorage in-line filtration of platelet concentrates. **Transfus. Sci.** **21**:123-128.
- Jayasuriya, N., Bosak, S., Regen, S, L. (1990). Design, synthesis, and activity of membrane-disrupting bolaphiles. **J. Am. Chem. Soc.** **112**:5844-5850.
- Jobe, A. H. (1993). Drug therapy- Pulmonary surfactant therapy. New Engl. **J. Med.** **328**:861-868.
- Johannsson, J., Curstedt, T. (1997). Molecular structures and interactions of pulmonary surfactant components. **Eur. J. Biochem.** **244**:675-693.
- Jones, L. S., Cipolla, D., Liu, J., Shire, S. J., Randolph, T. W. (1999). Investigation of protein-surfactant interactions by analytical ultracentrifugation and electron paramagnetic resonance: the use of recombinant human tissue factor as an example, **Pharm. Res.** **16**:808-812.
- Jones, M. N. (1999). Surfactants in membrane solubilisation. **Int. J. Pharm.** **177**:137-159.
- Jost, P., Libertini, L. J., Hebert, V. C., Griffith, O. H. (1971). Lipid spin labels in lecithin multilayers. A study of motion along fatty acid chains. **J. Mol. Biol.** **59**:77-98.
- Kahana, E., Streichman, S., Silver, B. L. (1991). The role of electrostatic forces in the interaction between the membrane and cytoskeleton of human erythrocytes. **Biochim. Biophys. Acta** **1066**:1-5.
- Kamiya, N., Goto, M., Nakashio, F. (1995). Surfactant-coated lipase suitable for the enzymatic resolution of menthol as a biocatalyst in organic media. **Biotechnol. Progr.** **11**:270-275.
- Katsu, T., Kuroko, M., Morikawa, T., Sanchika, K., Fujita, Y., Yamamura, H., Uda, M. (1989). Mechanism of membrane damage induced by the amphipathic peptides gramicidin S and melittin. **Biochim. Biophys. Acta** **983**:135-141.
- Kellermayer, M., Ludány, A., Miseta, A., Kôszegi, T., Berta, G., Bogner, P., Hazlewood, C. F., Cameron, I. L., Wheatley, D. N. (1994). Release of potassium, lipids, and proteins from nonionic detergent treated chicken red blood cells. **J. Cell. Physiol.** **159**:197-204.
- Koga, K., Murakami, M., Kawashima, S. (1997). Contribution of hydrophobicity of nonionic detergents to membrane lipid fluidity and disopyramide uptake by rat intestinal brush-border membrane vesicles. **Biol. Pharm. Bull.** **20**:674-679.
- Komives, C. F. Lilley, E., Russel, A. J. (1994). Biodegradation of pesticides in nonionic water-in-oil microemulsions of Tween-85 – relationship between micelle structure and activity. **Biotechnol. Bioenerg.** **43**:946-959.
- Kwon, G. S., Okano, T. (1999). Soluble self-assembled block copolymers for drug delivery. **Pharm. Res.** **16**:597-600.
- Lasch, J. (1995). Interaction of detergents with lipid vesicles. **Biochim. Biophys. Acta** **1241**:269-292.
- Lauriault, V. V. M., O'Brien, P. J. (1991). Disulfiram may mediate erythrocyte hemolysis induced by diethyldithiocarbamate and 1,4-naphthoquinone-2-sulfonate. **Arch. Bioch. Biophys.** **284**:207-214.

- Lawrence, M. J., Lawrence, S. M., Barlow, D. J. (1997). Aggregation and surface properties of synthetic double-chain non-ionic surfactants in aqueous solution. **J. Pharm. Pharmacol.** **49**:594-600.
- le Maire, M., Champeil, P., Moller, J. V. (2000). Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. **Biochim. Biophys. Acta** **1508**:86-111.
- Li, C. Y., Zimmerman, C. L., Wiedmann, T. S. (1996). Solubilization of retinoids by bile salt/phospholipid aggregates. **Pharm. Res.** **13**:907-913.
- Liang, E., Hughes, J. A. (1998). Membrane fusion and rupture in liposomes: Effect of biodegradable pH-sensitive surfactants. **J. Membr. Biol.** **166**:37-49.
- Lichtenberg, D. (1985) Characterization of the solubilization of lipid bilayers by surfactants. **Biochim. Biophys. Acta** **821**:470-478.
- Lichtenberg, D., Opatowski, E., Kozlov, M. M. (2000). Phase boundaries in mixtures of membrane-forming amphiphiles and micelle-forming amphiphiles, **Biochim. Biophys. Acta** **1508**:1-19.
- Lieber, M. R., Lange, Y., Weinstein, R. S., Steck, T. L. (1984). Interaction of chlorpromazine with the human erythrocyte membrane. **J. Biol. Chem.** **259**:9225-9234.
- Loizaga, B., Gurtubay, I. G., Macarulla, J. M., Goñi, F. M., Gómez, J. C. (1979). Membrane solubilization by detergents, and detergent/protein ratios. **Biochem. Soc. Trans.** **7**:148-150.
- Low, T. Y., Seow, T.K., Chung, M. C. M. (2002). Separation of human erythrocyte membrane associated proteins with one-dimensional and two-dimensional gel electrophoresis followed by identification with matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. **Proteomics** **2**:1229-1239.
- Lux, S. E. (1988). Hereditary in the membrane or metabolism of the red cell. In: **Cecil. Textbook of Medicine**, 18 th ed, W. B. Saunders Company. Philadelphia, 909-917.
- Macnab, G., Harington, J. S. (1967). Haemolytic activity of asbestos and other mineral dusts. **Nature** **214**:522-523.
- Malcolmson, C., Satra, C., Kantaria, S., Sidhu, A., Lawrence, M. J. (1998). Effect of oil on the level of solubilization of testosterone propionate into nonionic oil-in-water microemulsions. **J. Pharm. Sci.** **87**:109-116.
- Malheiros, S. V. P., de Paula, E., Meirelles, N. C. (1998). Contribution of trifluoperazine/lipid ratio and drug ionization to hemolysis. **Biochim. Biophys. Acta** **1373**:332-340.
- Malheiros, S. V. P., Meirelles, N. C., de Paula, E. (2000). Pathways involved in trifluoperazine, dibucaine and praziquantel induced hemolysis. **Biophys. Chem.** **83**:89-100.
- Maraculla, J. M., Alonso, A., Arrondo, J. L. R., Gonzáles-Mañas, J. M., Goñi, F. M., Gurtubay, J. L. G., Prado, A., Urbaneja, M. A. (1989). Membrane solubilization by the non-ionic detergent Triton X100. A comparative study including model and cell membranes. **Rev. Esp. Fisiol.** **45**:1-8.
- Marroum, P. J., & Curry, H. (1993). Red blood cell partitioning, protein binding and lipophilicity of six phenothiazines. **J. Pharm. Pharmacol.** **45**:39-42.

- Middelkoop, E., Lubin, B. H., Bevers, E. M., Op Den Kemp, J. A., Comfurius, P., Chiu, D. T. Y., Zwall, R. F. A., Deenen, L. L. M., Roelofsen, B. (1988). Studies on sickled erythrocytes provide evidence that the asymmetric distribution of phosphatidylserine in the red-cell membrane is maintained by both atp-dependent translocation and interaction with membrane skeletal proteins. **Biochim. Biophys. Acta** **937**:281-288.
- Minuth, T., Thommes, J., Kula, M. R. (1995). Extration of cholesterol oxidase from nocardia-rhodochrous using a nonionic surfactant-based aqueous 2-phase system. **J. Biotechnol.** **38**:151-164.
- Miseta, A., Bogner, P., Szarka, A., Kellermayer, M., Galambos, C., Wheatley, D. N., Cameron, I. L. (1995). Effect of non-lytic concentrations of Brij series detergents on the metabolism-independent ion permeability properties of human erythrocytes. **Biophys. J.** **69**:2563-2568.
- Molloy, M. P., Herbert, B. R., Walsh, B. J., Tyler, M. L., Traini, M., Sanchez, J. C., Hochstrasser, D. F., Williams, K. L., Gooley, A. A. (1998). Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis. **Electroph.** **19**:837-844.
- Montgomery, R. (1994). **Bioquímica - Uma Abordagem Dirigida por Casos**, 5^a. Ed. São Paulo.
- Moro, F., Goñi, F. M., Urbaneja, M. A. (1993). Fluorescence quenching at interfaces and the permeation of acrylamide and iodice across phospholipid bilayers. **FEBS Lett.** **330**: 129-132.
- Mosior, M., Bobrowska, M., Gomulkiewicz, J. (1990). Effect of the level of ATP and of the state of spectrin on osmotic properties of bovine erythrocytes. **Biochim. Biophys. Acta** **1022**:355-360.
- Murray, R. K. (1998). **Eritrócitos & Leucócitos** – Cap. 60, In: Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W., Harper: Bioquímica, 8^a ed. Atheneu.
- Nelson, D. L., Cox, M. M. (2000). **Leningher-Principles of Biochemistry**. 3rd ed. New York: Worth Publisher.
- Neugebauer, J. (1994). **A Guide to the Properties and Uses of Detergents in Biology and Biochemistry**. Calbiochem-Novabiochem Int. La Jolla.
- Nijtmans, L. G. J., Henderson, N. S., Holt, I, J. (2002). Blue Native electrophoresis to study mitochondrial and other protein complexes. **Methods.** **26**:327-334.
- Ohnishi, M., Sagitani, H. (1993). The effect of nonionic surfactant structure on hemolysis. **J. Am. Oil Chem. Soc.** **70**:679-684.
- Okamoto, Y., Ohkoshi, K., Itagaki, H., Tsuda, T., Kakishima, H., Ogawa, T., Kasai, Y., Ohuchi, J., Kojima, H., Kurishita, A., Kaneko, T., Matsushima, Y., Iwabuchi, Y., Ohno, Y. (1999). Interlaboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (3) evaluation of the haemolysis test. **Toxicol. In vitro** **13**:115-124.
- Ostolaza, H., Bartolome, B., Ortis-De-Zarate, I., De-La-Cruz, F., Goñi, F. M. (1993). Release of lipid vesicle contents by the bacterial protein toxin alpha-haemolysin. **Biochim. Biophys. Acta** **1147**:81-88.

- Pantaler, E., Kamp, D., Haest, C. W. M. (2000). Acceleration of phospholipid flip-flop in the erythrocyte membrane by detergents differing in polar head group and alkyl chain length. **Biochim. Biophys. Acta** **1509**:397-408.
- Partearroyo, M. A., Urbaneja, M. A., Goñi, F. M. (1992). Effective detergent/lipid ratios in the solubilization of phosphatidylcholine vesicles by Triton X-100. **FEBS Lett.** **302**:138-140.
- Patra, S. K., Alonso, A., Goñi, F. M. (1998). Detergent solubilization of phospholipid bilayers in the gel state: the role of polar and hydrophobic forces. **Biochim. Biophys. Acta** **1373**:112-118.
- Phizicky, E., Bastiaens, P. I., Zhu, H., Snyder, M., Fields, S. (2003). Protein analysis on a proteomic scale. **Nature** **422**:208-215.
- Platt, O. S., Falcone, J. F. (1995). membrane-protein interactions in sickle red-blood-cells - evidence of abnormal protein-3 function. **Blood** **86**:1992-1998.
- Platt, O. S., Lux, S. E., Falcone, J. F. (1993). A highly conserved region of human erythrocyte ankyrin contains the capacity to bind spectrin. **J. Biol. Chem.** **268**:24421-24426.
- Porter, M. R. (1991). In: Handbook of surfactants; Chapman & Hall, New York.
- Pratt, R. S., Cook, G. M. W. (1979). Solubilization of human erythrocyte membrane glycoproteins by Triton X-100. **Biochem. J.** **179**:299-303.
- Preté, P. S. C., Gomes, K., Malheiros, S. V. P., Meirelles, N. C., de Paula, E. (2002). Solubilization of human erythrocyte membranes by non-ionic surfactants of the polyoxyethylene alkyl ethers series. **Biophys. Chem.** **97**:45-54.
- Preté, P. S. C., Malheiros, S. V. P., Meirelles N. C., and de Paula, E. (2002). Quantitative assessment of human erythrocyte membrane solubilization by Triton X-100. **Biophys. Chem.** **97**:1-5.
- Przystalski, S., Hladyszowski, J., Kuczera, J., Rozycka-Roszak, B., Trela, Z., Chojnacki, H., Witek, S., Fiscaro, E. (1996). Interaction between model membranes and a new class of surfactants with antioxidant function. **Biophys. J.** **70**:2203-2211.
- Ramalingam, K., Bello, J. (1992). Effect of permethylation on the haemolytic activity of melittin. **Biochem. J.** **284**:663-665.
- Requero, M. A., Goñi, F. M., Alonso, A. (1995). The membrane-perturbing properties of Palmitoyl-coenzyme A and Palmitoylcarnitine - a comparative study, **Biochemistry** **34**:10400-10405.
- Requero, M. A., Gonzalez, M., Goñi, F. M., Alonso, A., Fidelio, G. (1995). Differential penetration of fatty acyl-coenzyme A and fatty acylcarnitines into phospholipid monolayers. **FEBS Lett.** **357**: 75-78.
- Restaino, L., Frampton, E. W., Bluestein, R. L., Hemphill, J. B., Regutti, R. R. (1994). Antimicrobial efficacy of a organic acid anionic surfactant against various bacterial strains. **J. Food Prot.** **57**:496-501.
- Ribas, A. M. (1997). **Estudo da Estabilidade de Bicamadas Lipídicas em Presença e Tensoativos.** Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas.
- Riechers, D. E., Wax, L. M., Liebl, R. A., Bush, D. R. (1994). Surfactant-increased glyphosate uptake into plasma-membrane vesicles isolated from common lambsquarters leaves. **Plant. Physiol.** **105**:1419-1425.

- Righetti, P. G., Bossi, A., Olivieri, E., Gelfi, C. (1999). Capillary electrophoresis of peptides and proteins in acidic, isoelectric buffers: recent developments. **J. Biochem. Biophys. Meth.** **40**:1-15.
- Rivas, M. G., Gennaro, A. M. (2003) Detergent resistant domains in erythrocyte membranes survive after cell cholesterol depletion: an EPR spin label study. **Chem. Phys. Lipids.** **122**:165-169.
- Salzer, U., Prohaska, R. (2001), Stomatin, flotillin-1, and flotillin-2 are major integral proteins of erythrocyte lipid rafts. **Blood** **97**:1141-1143.
- Samuel, B. U., Mohandas, N., Harrison, T., McManus, H., Rosse, W., Reid, M., Haldar, K. (2001). The role of cholesterol and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins of erythrocyte rafts in regulating raft protein content and malarial infection. **J. Biol. Chem.** **276**:29319-29329.
- Santana, M. H. A., Carbonell, R. G., Kilpatrick, P. K. (1993). **Surface modified liposomes in the presence of nonionic surfactants**. Relatório científico da Fapesp.
- Scherier, S. L. (1985). Red cell membrane biology. Introduction. **Clin. Haematol.** **14**:1-12.
- Schreier, S., Malheiros, S. V. P., de Paula, E. (2000). Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects. **Biochim. Biophys. Acta** **1508**:210-234.
- Schreier, S., Ernandes, J. R., Cuccovia, I. M., and Chaimovich, H. (1978). Spin label studies of structural and dynamic properties of detergent aggregates. **J. Magn. Res.** **30**:283-298.
- Schreier, S., Polnaszek, C. F., Smith, I. C. P. (1978). Spin labels in membranes. **Biochim. Biophys. Acta** **515**:375-436.
- Schroit, A. J., Zwall, R. F. A. (1991). Transbilayer movement of phospholipids in red-cell and platelet membranes. **Biochim. Biophys. Acta** **1071**:313-329.
- Schuck, S., Honsho, M., Ekroos, K., Shevchenko, A., Simons, K. (2003). Resistance of cell membranes to different detergents. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **100**:5795-5800.
- Seddon, A. M., Curnow, P., Booth, P. J. (2004). Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. **Biochim. Biophys. Acta** **1666**:105-117.
- Seeman, P. (1972). The membrane actions of Anesthetics and Tranquilizers. **Pharmacol. Rev.** **24**:583-655.
- Seeman, P., Shaáfi, R. I., Galey, W. R., Solomon, A. K. (1970). The effect of anesthetics (Chlorpromazine, ethanol) on erythrocyte permeability to water. **Biochim. Biophys. Acta** **211**: 365-368.
- Seeman, P., Weistein, J. (1966). Erythrocyte membrane stabilization by tranquilizers and antihistamines. **Biochem. Pharmacol.** **15**:1737-1752.
- Simons, K., Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. **Nature** **387**:569-572.
- Singer, S. J., Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science** **175**:720-731.

- Spinedi, A., Pacini, L., Limatola, C., Luly, P., Farias, R. N. (1992). Phenothiazines inhibit acetylcholinesterase by concentration-dependent-type kinetics. A Study with trifluoperazine and perphenazine. **Biochem. Pharmacol.** **44**:1511-1514.
- Storch, J., Kleinfeld, A.M. (1985). The lipid structure of biological membranes. **Trends Biochem. Sci.** **10**:418-421.
- Streichman, S., Kahana, E., Silver, B. L. (1991). EPR study of hydrophobic interaction of spectrin with fatty acids. **Biochim. Biophys. Acta** **1066**:9-13.
- Sun, Y., Gu, L., Tong, D., Bai, S., Ichikawa, S., Furusaki, S. (1999). Protein separation using affinity-based reversed micelles. **Biotechnol. Progr.** **15**:506-512.
- Tanford, C. (1980). **The hydrophobic effect: formation of micelles & biological membranes**, 2nd ed., John Wiley & Sons, New York.
- Thornalley, P. J. (1983). A mechanism for primaquine mediated oxidation of NADPH in red blood cells. **Biochem. Pharmacol.** **32**:3571-3575.
- Togo, T., Alderton, J. M., Bi, G. Q., Steinhardt, R. A. (1999). The mechanism of facilitated cell membrane resealing. **J. Cell. Sci.** **112**:719-731.
- Torchilin, V. P. (1998). Polymer-coated long-circulating microparticulate pharmaceuticals. **J. Microencapsul.** **15**:1-19.
- Torchilin, V. P. (2005). Lipid-core micelles for targeted drug delivery. **Curr. Drug. Deliv.** **4**:319-27.
- Trägner, D., Csordas, A. (1987). Biphasic interaction of Triton detergents with the erythrocyte membrane. **Biochem. J.** **244**:605-609.
- Tyers, M., Mann, M. (2003). From genomics to proteomics. **Nature** **422**:193-197.
- Uchegbu, I. F., Vyas, S. P. (1998). Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) in drug delivery. **Int. J. Pharm.** **172**:33-70.
- Vasilescu, M., Angelescu, D., Almgren, M., Valstar, A. (1999). Interactions of globular proteins with surfactants studied with fluorescence probe methods. **Langmuir** **15**:2635-2643.
- Victoria, E. J., Mahan, L. C. (1981). Some properties of alkali-extracted red cell ghost membranes. **Biochim. Biophys. Acta** **644**:226-232.
- Viguera, A. R., Gonzalez, M. J. M., Taneva, S., Goñi, F. M. (1994). Early and delayed stages in the solubilization of purple membrane by a polyoxyethylene surfactant. **Biochim. Biophys. Acta** **1196**:75-80.
- Viguera, A. R., Mencia, M., Goñi, F. M. (1993). Time-resolved and equilibrium measurements of the effects of poly(ethylene glycol) on small unilamellar phospholipid vesicles. **Biochemistry** **32**:3708-3713.
- Vyas, S. P., Jaitely, V., Kanaujia, P. (1997). Self-assembling supramolecular biovectors: A new dimension in novel drug delivery systems. **Pharmazie.** **52**:259-267.
- Wallace, D. C. (1999). Mitochondrial Diseases in Man and Mouse. **Science** **283**:1482-1488.
- Warren, R. C. (1987). **Physics and Architecture of Cell Membranes**, Adam-Hilger, Bristol, pp 1-26.

- Weber, K., Osborn, M. (1969). Reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **J. Biol. Chem.** **244**:4406.
- Weisz, P. B., Kumor, K., Macarak, E. J. (1993). Protection of erythrocytes against hemolytic agents by cyclodextrin polysulfate. **Biochem. Pharmacol.** **45**:1011-1016.
- Weltzien, H. U. (1979). Cytolytic and membrane-perturbing properties of lysophosphatidylcholine. **Biochim. Biophys. Acta** **559**:259-287.
- Wennerstrom, H., Lindman, B. (1979). Water penetration into surfactants micelles. **J. Phys. Chem.** **22**:2931-2932.
- Wilson, M. J., Richter-Lownwy K., Daleke D. L. (1993). Hyperglycemia induces a loss of phospholipid asymmetry in human erythrocytes. **Biochemistry** **32**:11302-11310.
- Wong, R. K. M., Nichol, C. P., Sekar, M. C., Roufogalis, B. D. (1987). The efficiency of various detergents for extraction and stabilization of acetylcholinesterase from bovine erythrocytes. **Biochem. Cell. Biol.** **65**:8-18.
- Xu, R. J., Vidal-Madjar, C., Sébille, B. (1998). Capillary electrophoretic behavior of milk proteins in the presence of non-ionic surfactants. **J. Chromatogr. B.** **706**:3-11.
- Yamamoto, A., Luo, A. M., Dodda-Kashi, S., Lee, V. H. L. (1989). The ocular route for systemic insulin delivery in the albino rabbit. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** **249**:249-255
- Yokoyama, M., Okano, T., Sakurai, Y., Ekimoto, H., Shibazaki, C., Kataoka, K. (1991). Toxicity and antitumor-activity against solid tumors of micelle-forming polymeric anticancer drug and its extremely long circulation in blood. **Cancer Res.** **51**:3229-3236.
- Yoon, K. A., Burgess, D. J. (1996). Effect of nonionic surfactant on transport of model drugs in emulsions. **Pharm. Res.** **13**:433-439.
- Yotsuyanagi, T., Mizutani, J., Iwata, M., Ikeda, K. (1983). Kinetic aspects and mechanism of liposome disintegration in polyoxyethylene lauryl ether and sodium cholate solutions. **Biochim. Biophys. Acta** **731**:304-311.
- Zhang, L., Xie, J., Wang, X., Liu, X., Tang, X., Cao, R., Hu, W., Nie, S., Fan, C., Liang, S. (2005). Proteomic analysis of mouse liver plasma membrane: Use of differential extraction to enrich hydrophobic membrane proteins. **Proteomics.** **5**: 4510-4524.
- Ziouzenkova, O., Asatryan, L., Sevanian, A. (1999). Oxidative stress resulting from hemolysis and formation of catalytically active hemoglobin: protective strategies. **Int. J. Clin. Pharm. Th.** **37**:125-132.

7 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

- Trabalhos em Congressos

- Internacional Workshop on Spectroscopy for Biology, São Paulo, SP, 2001. **Solubilization of human erythrocyte membranes by nonionic surfactants of the polyoxyethylene alkyl ether series** (P. S. C. Preté, K. Gomes, S. V. P. Malheiros, N. C. Meirelles e E. de Paula).
- XI COMAU – Congresso Médico Acadêmico da Unicamp, Campinas, SP, 2002. **Quantitative analysis of hemolytic effect caused by tween surfactants on human erythrocytes** (H. J. Alves, P. S. C. Preté e E. de Paula).
- HUPO 2nd Annual & IUBMB XIX World Congress, Montreal, Canadá, 2003. **Spin label study of the interaction between Triton X-100 and red blood cell** (P. S. C. Preté, S. V. P. Malheiros, N. C. Meirelles, E. de Paula e S. Schreier).
- XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular-SBBq, Caxambú, MG, 2003.
 1. **Interaction between Triton X-100 and red blood cells, as evaluated through EPR Spin label** (P. S. C. Preté, S. V. P. Malheiros, S. Schreier, N. C. Meirelles e E. de Paula).
 2. **Quantitative analysis of the hemolytic effect of C12Em surfactants on human erythrocytes** (H. J. Alves, J. F. Ferreira, R. Petroni, P. S. C. Preté e E. de Paula)
 3. **Self-Aggregation and erythrocyte membrane interaction of the zwitterionic surfactants ASB-14 and ASB-16** (C. C. Domingues, E. de Paula, P. S. C. Preté e S. V. P. Malheiros)
- XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular-SBBq, Caxambu, MG, 2004.
 1. **Quantitative analysis of the hemolytic effect of bile salts on human erythrocytes** (P. S. C. Preté, J. F. Ferreira, S. V. P. Malheiros, N. C. Meirelles, H. Hagerstrand e E. de Paula).
 2. **Quantitative analysis of the hemolysis induced by Renex surfactants of different polyoxyethylene chain length** (M. A. Paschoal, P. S. C. Preté, C. H. Tonhatti, N. C. Meirelles e E. de Paula).

- **Co-orientações:**

- Karina Gomes (Enfermagem, UNICAMP), Iniciação Científica (bolsista PIBIC/CNPq), *Solubilização de membranas de eritrócitos por surfatantes da séries CxEy (2000-2001)*.
- Hayda Josiane Alves (Enfermagem, UNICAMP), Iniciação Científica (bolsista PIBIC/CNPq), *Análise quantitativa do efeito hemolítico de surfatantes da séries Tween em eritrócitos humanos (2002-2004)*.
- *Josiane Francisca Ferreira (Enfermagem, PUCCAMP), Iniciação Científica (sem bolsa), Solubilização de membranas eritrocitárias por sais biliares (2004-2006)*.

- **Prêmios :**

- **Young Scientist**, concedido durante o HUPO 2nd Annual & IUBMB XIX World Congress, Montreal, Canadá, 2003.
- **Prêmio Mini-Caxambú**, concedido pelo IB/Unicamp pelo trabalho ao autor do melhor trabalho do Departamento de Bioquímica, apresentado durante a XXXII Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular de 2003.
- **XIII Prêmio Adolfo Lutz – Pesquisa Básica**, durante o XII COMAU, Congresso Médico Acadêmico da Unicamp, Campinas, SP, 2003..
- **XII Prêmio Adolfo Lutz – Pesquisa Básica**, durante o XI COMAU, Congresso Médico Acadêmico da Unicamp, Campinas, SP, 2002.

- **Artigos aceitos para publicação e submetidos**

- Preté, P. S. C., Malheiros, S. V. P., Meirelles, N. C., and de Paula, E. (2002) Quantitative assessment of human erythrocyte membranes solubilization by Triton X-100, **Biophys. Chem.** 97, 1-5.
- Preté, P. S. C., Gomes, K., Malheiros, S. V. P., Meirelles, N. C., and de Paula, E. (2002) Solubilization of human erythrocyte membranes by non-ionic surfactants of the polyoxyethylene alkyl ether series, **Biophys. Chem.** 97, 45-54.
- Preté, P. S. C., de Paula, E., Meirelles, N. C., Malheiros, S. V. P., Goñi, F. M., Schreier, S., Multiple stages of detergent-erythrocyte membrane interaction – A spin label study. (Submetido)