

Este trabalho foi aprovado
da tese defendida pela autora Lúcia
da Silva Ramos e aprovado pelo
Julgamento.



Lúcia da Silva Ramos

mem 15/04/91

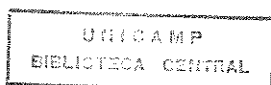
**INTERAÇÃO DE DETERGENTES NÃO-IÔNICOS COM A MEMBRANA ERITROCITÁRIA :
ESTUDO SOBRE A AÇÃO DOS DETERGENTES DA SÉRIE TWEEN**

Orientação : Profa. Dra. Nilce Correa Meirelles

Dissertação apresentada ao Departamento de
Bioquímica do Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
para a obtenção do grau de MESTRE EM CIÊNCIAS

Campinas, 1991.

30/9104662



Para meus pais
& para George.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Nilce Correa Meirelles, pela orientação, apoio e amizade .

Ao Prof. Dr. Urbano Meirelles que forneceu os detergentes Tween para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Neuza Maria Barbosa e Prof. Dr. Hiroshi Ayoama pela assistência e amizade.

À Profa. Dra. Iris Torriani e Prof. Antonio Carlos Zaccharias que propiciaram a realização dos estudos de difração de raios-X.

À Profa. Dra. Shirley Schreier e Profa. Eneida de Paula que propiciaram a realização dos estudos de RPE.

À Profa. e colega Ana Célia Ruggiero pelo auxílio na realização dos estudos de lipoperoxidação.

À Profa. Maria Risoleta F. Marques pela assistência dada para realização dos estudos de Eletroforese.

Ao Prof. Dr. Arício Linhares que propiciou a realização dos estudos de Microscopia.

Aos colegas Watson e Cláudio pela colaboração em várias etapas deste trabalho, incluindo a cuidadosa revisão deste manuscrito

As técnicas Jedida N. Souza e Regina Célia Rossetto pela dedicação e amizade.

A todos os colegas da Unicamp e Usp.

ÍNDICE

ABREVI AÇÕES	iv
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
 Introdução	 1
A. Detergentes	1
1. Classificação dos detergentes	2
2. Propriedades físico-químicas dos detergentes.....	4
a. Concentração micelar crítica	4
b. Número de agregação	5
c. Balanço hidrofílico-lipofílico	5
3. O uso dos detergentes	6
B. Membranas Biológicas	7
1. Movimentos dos componentes de membranas	8
2. Componentes principais da membrana plasmática	
do eritrócito	10
3. Interação de detergentes com membranas	12
C. Aplicação de técnicas físicas para o estudo	
de Biomembranas	15
1. Ressonância Paramagnética Eletrônica	15
a. O método do marcador de spin	15
b. Espectro de ressonância paramagnética	
eletrônica de Nitróxidos	19

2. Difração de raios-X a baixo ângulo	26
D. Objetivos	29
E. Os compostos estudados	30
Materiais e Métodos	33
1. Os detergentes estudados	33
2. Teste para determinação da auto-oxidação dos estoques de detergentes Tween	35
3. Determinação espectrofotométrica da CMC do Tween 80	36
4. Preparação de eritrócitos íntegros e de "ghosts"	37
5. Microscopia dos eritrócitos	39
6. Testes hemolíticos	40
7. Determinação do grau de lipoperoxidação	41
8. Determinação eletroforética do padrão proteico de "ghosts" tratados com os detergentes Tween	42
9. Estudos de Ressonância Paramagnética eletrônica	44
10. Estudos de difração de raios-X a baixo ângulo	48
Resultados	51
1. Teste para determinação da auto-oxidação dos detergentes Tween.....	51
2. Determinação espectrofotométrica da CMC do Tween 80	51
3. Microscopia dos eritrócitos	55
4. Testes hemolíticos	57

5. Determinação do grau de lipoperoxidação	62
6. Determinação eletroforética do padrão proteico de "ghosts" tratados com os detergentes Tween	64
7. Estudos de Ressonância Paramagnética eletrônica	66
8. Estudos de difração de raios-X a baixo ângulo	77
Discussão	81
Conclusões	99
Referências bibliográficas	101

ABREVIACÕES

CI- "color index"

CMC- concentração micelar crítica.

CTAB- brometo de decil-trimetil-amônio

D/L- detergente/lípido

HLB- balanço lipofílico-hidrofílico.

Ht- hematócrito

MDA- malonildialdeído

N- número de agregação.

NO- nitróxido

PBS- "phosphate buffer saline"

RPE/EPR- ressonância paramagnética eletrônica

5-SASL- "stearic acid spin label"

SDS- dodecil-sulfato de sódio

TCA- ácido tricloro acético

TBA- ácido tio-barbitúrico

RESUMO

Neste trabalho foram detectados aspectos físico-químicos da interação dos detergentes não-iônicos polioxietileno-sorbitol (Tween 20, 40, 60, 80) com a membrana eritrocitária através da utilização das técnicas de RPE e difração de raios-X.

Os compostos testados apresentaram um comportamento bifásico, em relação à promoção da hemólise hipoosmótica, dependente da concentração em que são utilizados.

Foram observadas alterações morfológicas nos eritrócitos tratados com os detergentes, detectando-se a presença de formas crenadas e "cup-form".

Os espectros de RPE do marcador 5-SASL analisados em função da razão detergente:lipídio mostraram que quando esta razão era pequena (e em termos do processo hemolítico havia um efeito de diminuição dessa taxa) nenhum efeito na estrutura da membrana foi observado. A medida que essa razão aumenta, há a formação de agregados polidispersos (detergente-lipídio) e a promoção da hemólise. Tais efeitos mostram ser dependentes da razão detergente:lipídio e não da presença do detergente na sua forma micelar.

Os padrões da difração de raios-X obtidos mostraram que o detergente não afeta a ordem da membrana nem produz separação de fase quando protege a célula do "stress" hipoosmótico, havendo indicações da ocorrência de mudanças estruturais apenas.

ABSTRACT

Here we present EPR and X-ray diffraction studies of the interaction of non-ionic polyoxyethylene-sorbitan derived detergents (Tween 20, 40, 60, 80) on rat erythrocytes, regarding to its physical-chemical aspects.

The compounds showed a biphasic behaviour in relation to the promotion hemolysis depending on their concentration.

Changes in the morphological cell patterns were observed in detergent-treated erythrocytes and typical crenated and cup form erythrocytes were detected.

The EPR spectra of a spin labeled stearic acid (5-SASL) were analyzed as a function of the detergent:lipid (D/L) ratio. At low D/L ratio, protection against hypoosmotic lysis was observed and no major effect on membrane structure was detected. Increasing D/L ratios give rise to increasing amounts of polydisperse (mixed) aggregates, indicating that the effects depend on the D/L ratio, rather than on the presence of micellar detergent.

X-ray diffraction patterns obtained for detergent-treated ghosts at hemolysis-protective concentration showed that the detergent presence does not affect the membrane order, neither leads to phase separation. The results are indicative of structural changes only.

INTRODUÇÃO

A- Detergentes

Detergentes são também conhecidos como agentes tensoativos ou surfatantes. Tais compostos químicos tem uma natureza dual, possuindo uma porção hidrofóbica (mais solúvel em solventes apolares) e uma porção hidrofílica (mais solúvel em água). Em virtude dessa natureza dual dos detergentes, suas moléculas migram para interface(s) quando colocadas em solução, resultando uma diminuição da tensão superficial da solução em relação à do solvente puro. O alinhamento das moléculas de detergente nas interfaces (porção hidrofóbica para o ar ou na fase apolar, e porção hidrofílica para a água) reflete a tendência de assumir a orientação termodinamicamente mais favorável (ATTWOOD e FLORENCE, 1983).

Detergentes também exibem auto-agregação. Quando em baixa concentração em solução aquosa, eles se encontram como monômeros dispersos. Acima de uma faixa de concentração característica (específica para cada tipo de surfatante) as moléculas de detergente se agregam formando estruturas denominadas micelas. O estreito intervalo de concentração no qual se inicia a formação de micelas é denominado de concentração micelar crítica (CMC). A figura 1 mostra a estrutura generalizada de uma micela de detergente em solução aquosa, onde podemos observar que as porções hidrofóbicas estão em contato uma com as outras no núcleo micelar e as porções hidrofílicas formam uma camada em contato

com o meio aquoso. O número de monômeros que se reúnem para formar uma micela é chamado de número de agregação (N). Mais adiante as propriedades físico-químicas dos detergentes (como CMC, N e outras) serão mais detalhadamente apresentadas.

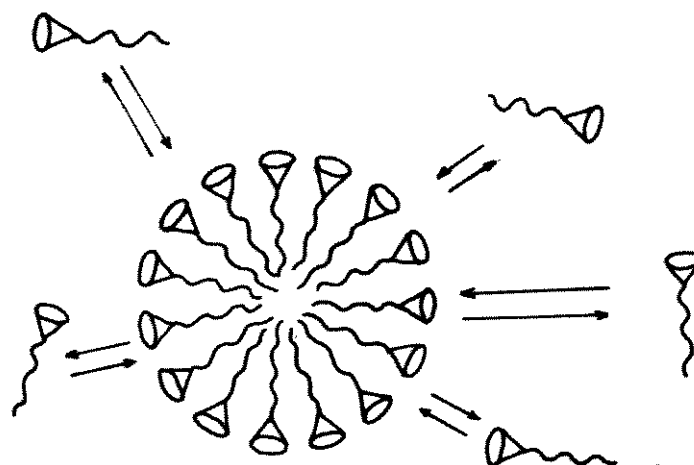


Figura 1. Representação esquemática de uma micela em meio aquoso (NEUGEBAUER, 1988).

1- Classificação dos detergentes

Usualmente os detergentes são classificados com base (i) na carga e/ou natureza da sua porção hidrofílica ("cabeça"), e (ii) na flexibilidade e/ou natureza química da porção hidrofóbica ("cauda") (COLEMAN, 1977).

Os grupos "cabeça" podem ser aniônicos, catiônicos, zwitteriônicos ou não-iônicos. Como exemplos de cabeças aniônicas temos

os grupos carboxilato, sulfato ou sulfonato. Detergentes aniônicos comercialmente disponíveis são os sais de metais alcalinos (sódio ou potássio). Cabeças catiônicas normalmente são compostos de amônio quaternário, disponíveis comercialmente como haletos, como por exemplo o brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB). Cabeças zwitteriônicas contêm tanto uma porção negativamente carregada quanto uma porção positivamente carregada, e como exemplo temos as betainas e sulfobetainas. Por sua vez, os detergentes com cabeças não-iônicas não contêm carga, sendo suas propriedades hidrofílicas devidas aos seus grupos polioxietileno ou açúcares. A tabela 1 mostra a estrutura e algumas propriedades de alguns detergentes classificados pela natureza de suas porções hidrofílicas.

Quanto ao tipo de porção hidrofóbica, em se tratando dos detergentes usados em pesquisa bioquímica, é comum encontrarmos hidrocarbonetos alifáticos ou esteróides. As cadeias de hidrocarbonetos alifáticos são mais flexíveis, enquanto que as de esteróides são mais rígidas.

Classificação dos surfatantes (FENDLER e FENDLER, 1975)

Nome	Fórmula estrutural	CMC mmoles/l	N
catiônico			
CTAB $\begin{matrix} X=Br \\ n=15 \end{matrix}$	$CH_3-(CH_2)_n-N^+(CH_3)_2X^-$	0,92	61
aniônico			
SDS $\begin{matrix} M=Na \\ n=11 \end{matrix}$	$CH_3-(CH_2)_n-OSO_3^-M^+$	8,1	62
não-iônicos			
Brij 35 $n=29$	$C_{12}H_{25}-(OCH_2CH_2)_n-OH$	0,08	50
zwitteriônicos			
DDAPS $n=11$	$CH_3-(CH_2)_n-N^+(CH_3)_2-(CH_2)_9SO_3^-$	1,2	-

Tabela 1. Exemplos de alguns surfatantes comercialmente disponíveis e algumas de suas propriedades físico-químicas (CMC e N).

2- Propriedades físico-químicas dos detergentes

a. Concentração micelar crítica (CMC)

A concentração micelar crítica (CMC) é o limite de concentração do detergente a partir do qual micelas são formadas. A CMC é um evento que ocorre abruptamente, sobre uma faixa muito estreita de concentração, e as moléculas de detergente adicionadas à uma solução que

já se encontre na sua CMC serão incorporadas em micelas. Soluções acima da CMC serão compostas de micelas em equilíbrio com os monômeros.

b. Número de agregação (ND)

Quando se designa um dado número de agregação para um detergente, pode-se incorrer no erro de imaginar agregados bem definidos e estáticos em solução. Em contraste, as micelas são estruturas dinâmicas, sendo que a troca de monômeros entre as micelas e a fase aquosa ocorre constantemente (WENNERSTRÖN e LINDMAN, 1979). O número de agregação é uma média da composição micelar num dado período de tempo e é estimado pela divisão do peso molecular da micela pelo peso do monômero do detergente (NEUGEBAUER, 1988).

c. Balanço hidrofílico-lipofílico (HLB)

Um parâmetro adicional usado especialmente para caracterizar detergentes não-iônicos do tipo polioxietileno, é o balanço hidrofílico-lipofílico (HLB). O HLB é uma expressão direta do caráter hidrofílico do surfactante : quanto maior o HLB, mais hidrofílico é o composto (NEUGEBAUER, 1988).

O HLB de um detergente pode ser um indicativo de suas propriedades. Por exemplo, a extração por detergente de alguns componentes de membranas pode ser correlacionada com o HLB. Em geral,

detergentes com HLB entre 12-14,5 são melhores para extração de proteínas integrais da membrana. Já detergentes com HLB de valores maiores (15 -20) são melhores para extração de proteínas extrínsecas (UMBREIT e STROMINGER, 1973; SLINDE e FLATMARK, 1976).

O HLB é um parâmetro útil também para se predizer o comportamento do detergente numa fase hidrofóbica. Se o HLB for muito alto, o detergente solubiliza-se menos nesta fase.

3- O uso dos detergentes

Basicamente em estudos bioquímicos podemos utilizar os detergentes como:

a. agentes de dissolução de drogas e de facilitação de penetração de fármacos através de membranas biológicas (ATTWOOD e FLORENCE, 1983).

b. agentes coadjuvantes em muitas técnicas como eletroforese , focalização isoelétrica e outras técnicas correlatas (BJERRUM e LUNDAHL, 1974; DULANEY e TOUSTER, 1970; FIELD e LEE, 1985).

c. sistemas modelo para o estudo de membranas (FENDLER, 1982).

d. agentes para isolamento e estudo de proteínas de

membranas (KUHLBRANDT, 1988).

e. agentes para reconstituição de proteínas de membranas em sistemas de lipossomas (KLAUSNER, 1984).

f. agentes para o preparo de lipossomas (ALMONG, 1986).

B- Membranas Biológicas

Membranas biológicas são barreiras que separam dois meios distintos, desta forma mantendo a integridade da célula. Basicamente as membranas biológicas são constituídas de lipídios, proteínas (que na maioria das vezes aparecem na mesma proporção) e carboidratos (que quando presentes, aparecem em menor quantidade e são encontrados na forma de glicoproteínas ou glicolipídios), sendo usualmente descritas pelo modelo do mosaico fluido proposto por SINGER e NICOLSON (1972) que é mostrado esquematicamente na figura 2. Neste modelo, o mais amplamente aceito até hoje, os lipídios se organizam em forma de bicamada, e as proteínas permeiam essa estrutura de forma a constituírem um arranjo extremamente dinâmico (RAWN, 1989).

A membrana que separa a célula do meio extracelular recebe o nome de membrana plasmática e é uma estrutura altamente organizada que possui de 6 a 10 nm de espessura. A membrana plasmática é uma barreira de permeabilidade seletiva que controla o fluxo de moléculas para dentro e para fora da célula, e que, no caso de bactérias, também participa da

produção de energia metabólica. Além disso ela contém moléculas em sua superfície que servem para o reconhecimento e comunicação da célula. Nas células eucarióticas além da membrana plasmática, existem muitas membranas internas que envolvem organelas celulares, desempenhando funções definidas.

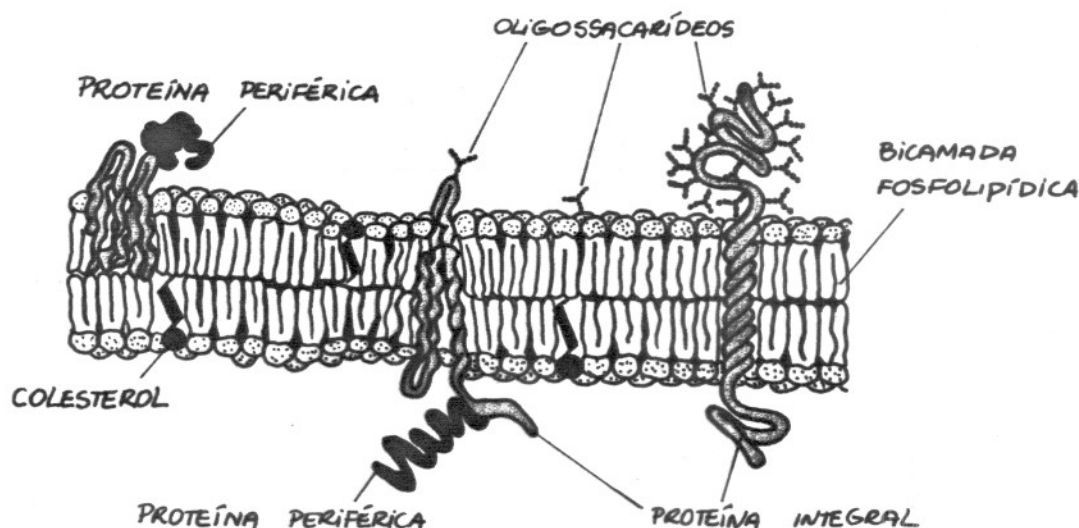


Figura 2. Modelo do mosaico fluido inicialmente proposto por SINGER e NICHOLSON (1972).

1-Movimentos dos componentes de membranas

Membranas biológicas são estruturas dinâmicas e seus componentes descrevem movimentos do tipo translacional (difusão lateral), rotacional, "flip-flop" (entre camadas) e movimento das cadeias alifáticas (FINEAN et alii, 1984). Na figura 3 temos

representados esquematicamente os movimentos descritos pelos fosfolipídios.

As estruturas formadas por fosfolipídios são sensíveis a variações de temperatura, podendo ocorrer em fases distintas (gel ou cristal líquido). A temperatura em que ocorre a mudança de fase de dispersões lipídicas é chamada de "temperatura de transição de fase" (T_c) (FENDLER e FENDLER, 1975). Quando a temperatura é baixa as ligações simples carbono-carbono das cadeias alifáticas dos fosfolipídios apresentam-se todas em conformação trans (situação de maior rigidez que caracteriza a fase gel). Já quando há um aumento de temperatura as ligações carbono carbono podem sofrer rotação, sendo encontradas também em conformação gauche (situação de maior mobilidade que caracteriza a fase de cristal líquido). Quando a membrana se encontra em estado de cristal líquido também pode ser observada a rotação rápida em torno do eixo longo molecular dos lipídios. Esse movimento de rotação também pode ser efetuado por proteínas (FINEAN, et alii, 1984)

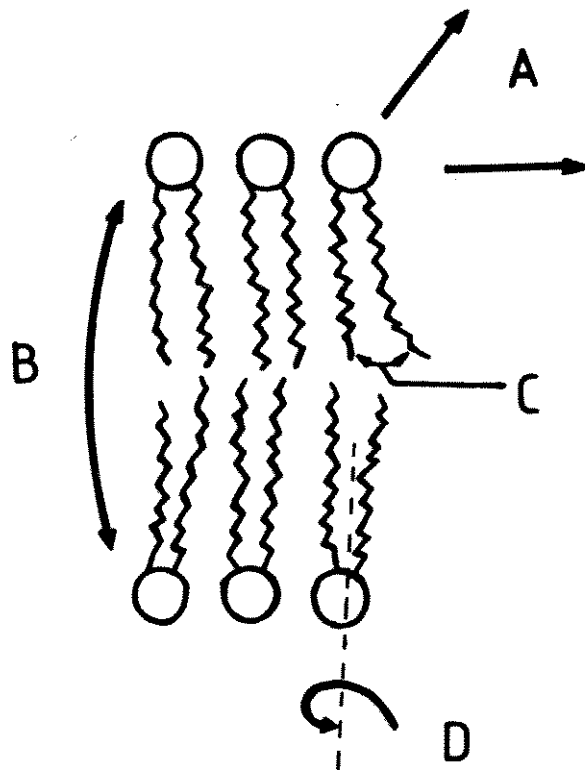


Figura 3. Tipos de movimentos dos componentes lipídicos da bicamada: (A) difusão lateral; (B) "flip-flop"; (C) movimento das cadeia alifáticas; (D) movimento em torno do eixo longo molecular (BIANCONI, 1990).

2- Os componentes principais da membrana plasmática do eritrócito

Pelo fato de poder ser manipulada sem a interferência de outros componentes celulares, a membrana eritrocitária é um modelo muito usado para o estudo da estrutura e função de membranas biológicas (BRETSCHER e RAFF, 1975).

Quanto aos seus componentes proteicos, esses podem ser determinados através de eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS e coloração com "coomassie blue" (BRANTON et alii., 1981). Em quase todas as membranas plasmáticas de eritrócitos de vertebrados encontraremos os mesmos componentes proteicos, os quais, majoritariamente, são constituídos por duas proteínas integrais, a glicoforina e a banda 3 transportadora de ions. Outras proteínas identificadas são as que compõem o citoesqueleto celular e que incluem a espectrina, banda 4.1 e actina. Identifica-se ainda a anquirina, uma proteína que possui a função de ancorar as proteínas do citoesqueleto às proteínas integrais da membrana (MARCHESI, 1985).

Quanto aos seus componentes lipídicos, os glicerofosfolipídios são a principal classe encontrada, constituindo aproximadamente 50% da composição total de lipídios da membrana (ROTHMAN, 1977). Os glicerofosfolipídios constituem-se de um esqueleto de glicerol esterificado em duas posições por ácidos graxos e, em uma posição, por um grupo fosfato. Excetuando-se o ácido fosfatídico, em todos os glicerofosfolipídios encontram-se esterificados ao grupo fosfato diferentes álcoois que servem para sua classificação. Uma segunda classe de lipídios que constituem a parte lipídica da membrana (aproximadamente 18%) são os esfingolipídios (ROTHMAN, 1977), que tem como estrutura base a esfingosina ao invés do glicerol. Estes dois componentes (glicerofosfolipídios e esfingolipídios) espontaneamente formam a estrutura em bicamada da membrana (STORCH e KLEINFELD, 1985).

Uma terceira classe de lipídios, que constitui cerca de 23% da composição total de lipídios da membrana é o colesterol (ROTHMAN,

1977). O colesterol, por possuir uma estrutura de anéis muito rígida e caudas apolares muito grandes, sozinho não se organiza em bicamada (RAWN, 1989) .

3- Interação de detergentes com membranas

Uma grande variedade de detergentes é usada para o isolamento e estudo de proteínas integrais da membrana. Apesar da interação de detergentes com membranas não ser completamente descrita, tem sido proposto um mecanismo genérico de quatro passos (NEUGEBAUER, 1988), para a interação de detergentes com membranas (figura 4):

- .o detergente se liga à membrana

- .ocorre a desintegração da membrana

- .a membrana é solubilizada na forma de complexos mistos de detergente-lipídio-proteína.

- .os complexos detergente-lipídio-proteína se reorganizam formando complexos detergente-lipídio e complexos detergente-proteína.

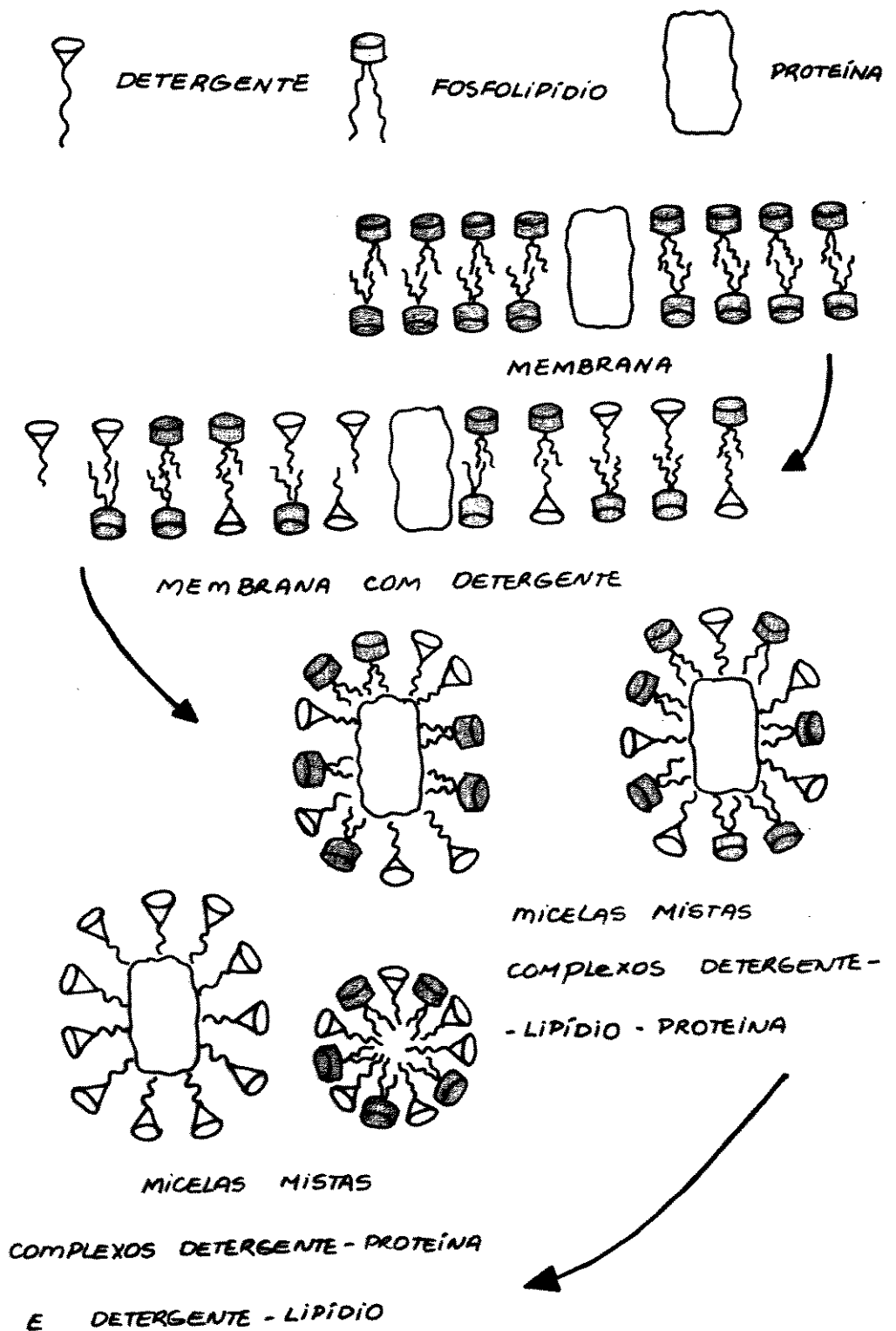


Figura 4. Representação esquemática da solubilização de membranas celulares por detergentes (NEUGEBAUER, 1988).

Nesta interação entre detergentes e membranas, os detergentes da classe dos não iônicos têm demonstrado ser os menos danosos para as membranas (LICHTENBERG et alii, 1983). Pelo fato de muitas formulações alimentícias e farmacêuticas conterem detergentes não iônicos, muitos estudos sobre a ação destes detergentes têm sido feitos com o intuito de esclarecer a natureza dessa interação aparentemente favorável para as membranas (FLORENCE et alii, 1984). Estudos feitos sobre a atividade hemolítica de detergentes não-iônicos derivados do polioxietileno (TRAGNER e CSORDAS, 1987) demonstraram que estes compostos, assim como alguns anestésicos lipofílicos e tranquilizantes fenotiazínicos (SEEMAN, 1966a; SEEMAN e WEINSTEIN, 1966) podem estabilizar o eritrócito contra o "stress" hipoosmótico. Segundo estes estudos baixas concentrações destes compostos aumentariam a resistência osmótica dos eritrócitos, enquanto que concentrações mais altas levariam à hemólise. Alguns estudos foram feitos no sentido de avaliar a natureza do comportamento hemolítico (HAMADA et alii, 1984; HAMADA et alii, 1982 ; AZAZ et alii, 1981) e do comportamento protetor (CSORDAS e SCHAUENSTEIN, 1984) de alguns anfifílicos, mas o mecanismo destes processos ainda não foi elucidado.

C- Aplicação de Técnicas Físicas para o Estudo de Biomembranas

1- Ressonância Paramagnética Eletrônica

a- Método do Marcador de Spin

O método do marcador de spin consiste no emprego de uma molécula sonda, através de cujo espectro de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) se procura obter informações de caráter estrutural ou conformacional do sistema ao qual a molécula sonda se encontra intercalada. Esta possibilidade de obtenção de informação a respeito de transições conformacionais se deve ao fato do RPE ser uma técnica que opera na região de microondas (9 a 35 GHz) do espectro eletromagnético (CARRINGTON et alii, 1967), e que na presença de um campo magnético, detecta elétrons desemparelhados. Assim sendo podemos obter informações conformacionais de macromoléculas ou agregados, por ser justamente na região de microondas que ocorrem os movimentos desses sistemas.

A ressonância paramagnética eletrônica é uma técnica espectroscópica que depende da presença de moléculas paramagnéticas (moléculas com elétrons desemparelhados que apresentam momento dipolar) e se baseia na aplicação de um campo magnético H , sob ação do qual os níveis de energia do momento magnético de spin (MS) se tornam divergentes (figura 5) (WERTZ e BALTON, 1972). Quando se aplica a energia eletromagnética ($h\nu$) que proporcione a condição de ressonância (transição entre os dois níveis de energia), haverá absorção de energia. Esta absorção de energia vai gerar um espectro que normalmente

é registrado na forma da derivada primeira da absorção. A análise da posição e forma das linhas em sistemas isotrópicos pode dar informações sobre a velocidade de rotação do marcador, sobre a estrutura, ordem e polaridade do sistema estudado.

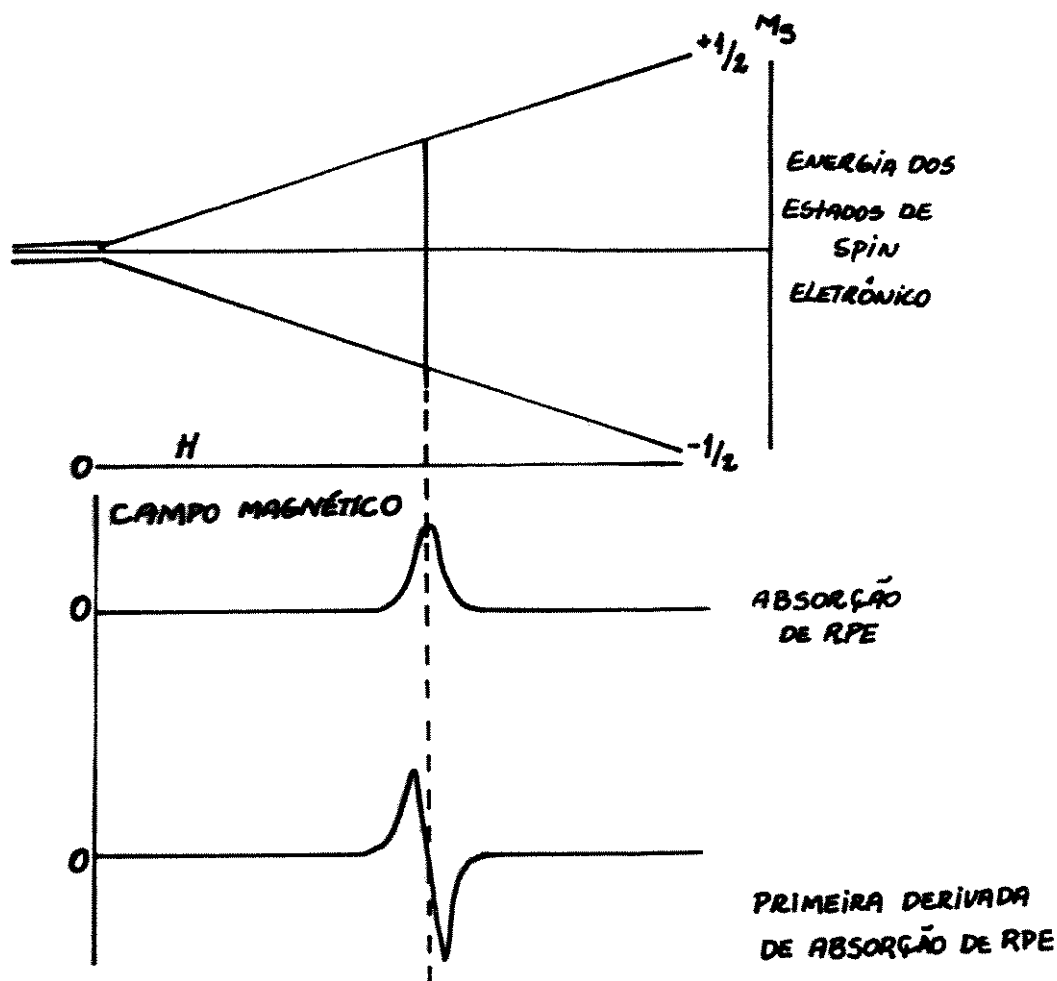


Figura 5. Desdobramento dos níveis de energia do spin eletrônico em presença de um campo magnético (H). Os espectros de RPE registram, em geral, a derivada primeira da absorção. (M_S corresponde ao momento magnético de spin eletrônico)

A energética de transições envolvendo momento magnético de spin pode ser representado através da equação hamiltoniana de spin que é expressa :

$$(1) \quad \mathcal{H} = \beta_e \vec{H} \cdot \vec{g} \cdot \hat{S} + \hat{S} \cdot \vec{T} \cdot \hat{I} + \beta_N \vec{H} \cdot \vec{g}_N \cdot \hat{I} + \mathcal{H}_{troca} + \mathcal{H}_{dipolo}$$

onde o primeiro termo representa a interação do campo magnético com o spin eletrônico (interação eletrônica do tipo Zeeman), o segundo termo a interação hiperfina (spin eletrônico- spin nuclear), o terceiro a interação entre o spin nuclear e o campo magnético (que é desprezível nas condições normais do experimento de RPE) e $\mathcal{H}_{troca}$ e $\mathcal{H}_{dipolo}$ representam as energias envolvidas em interações entre elétrons livres, que só ocorrem em bi ou poli radicais ou em concentrações elevadas de monoradicaís. O termo $\mathcal{H}_{troca}$ depende da interação dos orbitais dos radicais e $\mathcal{H}_{dipolo}$ depende da geometria do sistema uma vez que envolve uma dependência angular. Na equação (1), $\vec{H}$ é o vetor de campo magnético, β_e e β_N são os magnetons eletrônico e nuclear respectivamente, $\vec{g}_N$ é o fator de desdobramento nuclear de Zeeman, $\vec{g}$ é o tensor g do elétron, $\hat{S}$ é o operador de momento angular de spin nuclear e $\vec{T}$ é o tensor do desdobramento hiperfino.

O elétron desemparelhado pode ser afetado pela interação com núcleos vizinhos. No caso de sondas de spin que contenham o radical nitróxido (NO), há o desdobramento em três picos da absorção do spin eletrônico devido à sua interação com o átomo de nitrogênio que também é paramagnético e tem momento dipolar (MD) de spin nuclear igual a 1

podendo, na presença de um campo magnético, apresentar valores +1, 0, -1. A interação entre o spin nuclear (I) e o spin eletrônico (S) dá origem ao desdobramento hiperfino (segundo termo da equação 1). O spin nuclear sendo igual a 1 causa o desdobramento de cada nível energético de spin eletrônico em três (figura 6). Portanto, na ausência de interação do spin eletrônico ($\mathcal{H}_{\text{troca}}$ e $\mathcal{H}_{\text{dipolo}} = 0$), podem ser observadas três transições, uma vez que somente transições com $\Delta M_I = 0$ são permitidas. A separação entre as linhas é o desdobramento hiperfino (SCHREIER, 1979).

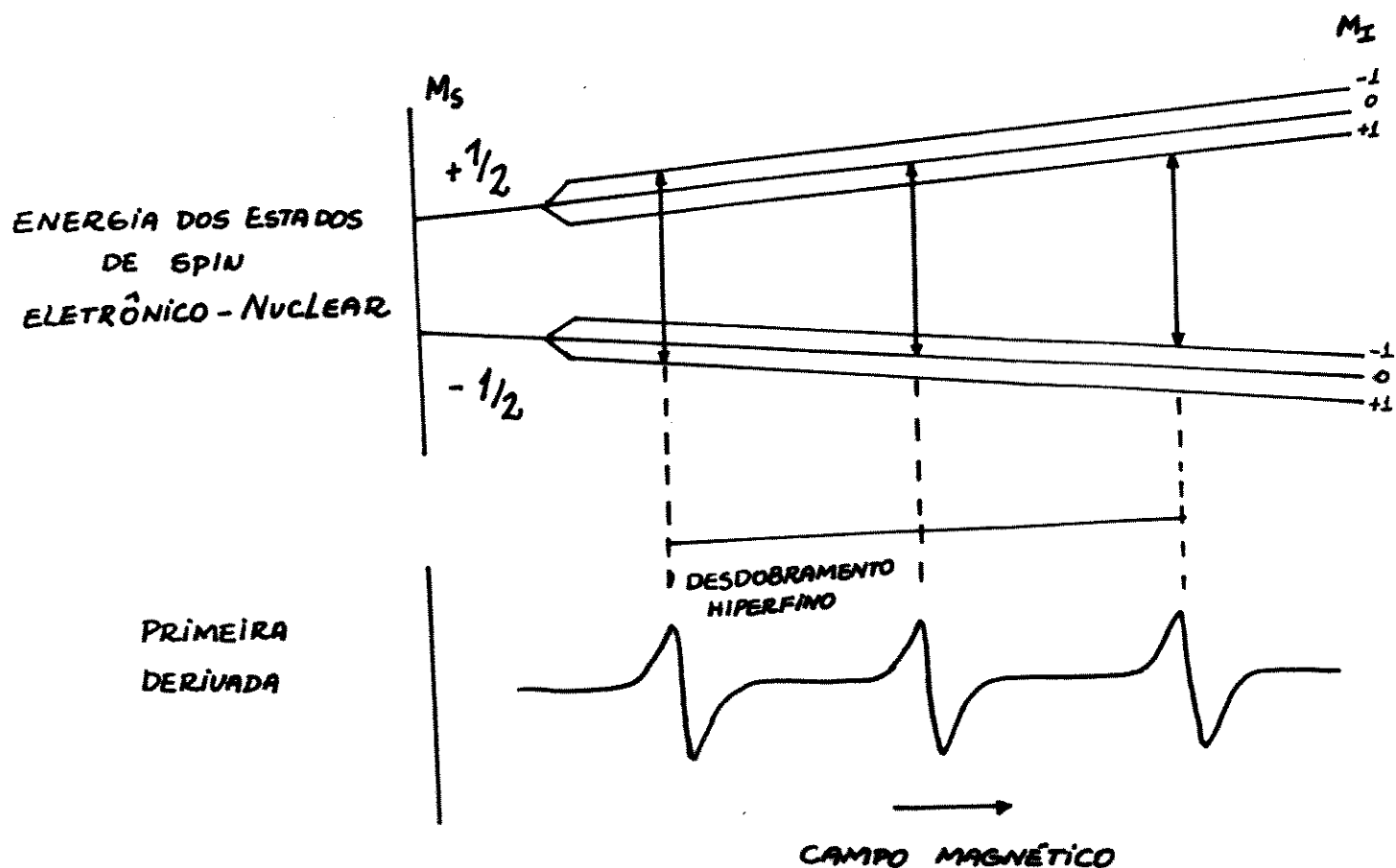


Figura 6. Desdobramento dos níveis de energia do spin eletrônico para um átomo de spin nuclear (I) igual a 1. A separação entre as linhas é o desdobramento hiperfino. (M_S corresponde ao momento magnético de spin eletrônico, e M_I ao momento de spin nuclear).

b- Espectro de Ressonância Paramagnética Eletrônica de Nitróxidos

O radical nitróxido (figura 7), mencionado anteriormente, é o mais utilizado como marcador de spin por ser bastante estável em

amplas faixas de temperatura e pH (incluindo o fisiológico) e também em vários solventes. A presença de grupos metila nos carbonos vizinhos ao átomo de nitrogênio lhe confere estabilidade adicional. O desenvolvimento da química do radical nitróxido serviu de fundamento ao método de marcação de spin originariamente proposto por OHNISHI e McCONNELL (1965) e que hoje é bastante empregado para o estudo de sistemas biológicos, em particular no campo de membranas. Este método consiste em colocar um radical com um grupo NO estável no sistema em estudo, seja por meio de uma reação que leva a uma ligação covalente a uma molécula do sistema, seja simplesmente introduzindo o radical no sistema de estudo (sob a forma de sonda de spin) no qual ele é dissolvido sem uma ligação permanente às suas moléculas. Como a maioria dos sistemas estudados é diamagnética, o sinal de RPE do fragmento NO é o único sinal presente.

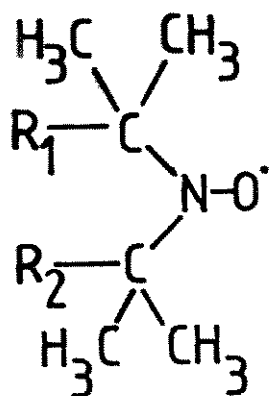


Figura 7. Radical Nitróxido.

Para os radicais nitróxido livres utilizados no tratamento de membranas os termos da hamiltoniana de spin são:

$$(2) \quad \mathcal{H} = \beta \cdot \mathbf{s} \cdot \mathbf{g} \cdot \mathbf{H} + \mathbf{s} \cdot \mathbf{A} \cdot \mathbf{I}$$

onde $\mathbf{s}$ e $\mathbf{I}$ são operadores de spin eletrônico e spin nuclear respectivamente, $\mathbf{H}$ é o vetor de campo magnético e $\mathbf{g}$ e $\mathbf{A}$ são os dois tensores que descrevem a interação do elétron não emparelhado com o campo magnético nuclear do nitrogênio. Devido à anisotropia de $\mathbf{g}$ e $\mathbf{A}$ os espectros observados são dependentes da liberdade de movimentação do marcador de spin. Um parâmetro utilizado como medida do grau de liberdade de movimentação do marcador é o tempo de correlação (τ_c) que é definido como o tempo necessário para que ocorra a rotação de um radiano numa molécula, em relação à sua orientação prévia (SANDERBERG et alii, 1969).

As técnicas de ressonância paramagnética podem ser comparadas às demais técnicas espectroscópicas no sentido em que se mede uma absorção de energia em função da energia aplicada, correspondente à transição do estado fundamental para o estado excitado (de acordo com as leis da mecânica quântica). O emprego desta técnica nos fornece gráficos da derivada primeira da absorção de energia pelo elétron desemparelhado do radical da molécula sonda.

Em casos extremos, onde a molécula sonda descreve movimento muito lento para a escala de tempo de RPE ($\tau_c > 3 \times 10^{-7}$ s), o espectro obtido (chamado espectro de pó) será a resultante de uma somatória de todas as orientações possíveis em relação ao campo

magnético.

O parâmetro de ordem (S) é uma medida da orientação média de um eixo molecular em relação a um eixo de referência (diretor). Em geral, o eixo diretor é tomado como a normal à superfície da bicamada.

Para moléculas que descrevem movimento perfeitamente isotrópico, o parâmetro de ordem será igual a zero ($S = 0$). De forma análoga, para uma molécula perfeitamente orientada, S será igual a um. Em casos intermediários, S é relacionado à amplitude angular do movimento anisotrópico da molécula na bicamada (Fig.8):

$$(3) \quad S = \frac{1}{2} (3 \langle \cos^2 \beta \rangle - 1)$$

onde β é o ângulo formado entre o eixo longo molecular e a normal à bicamada.

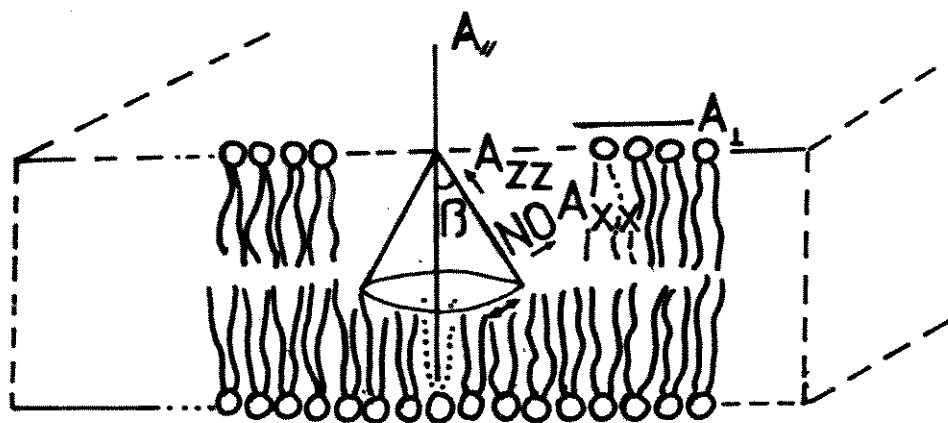


Figura 8. Movimento anisotrópico de um marcador de spin na porção lipídica da membrana. A direção A_{zz} é paralela à normal à superfície da bicamada.

Para o cálculo de S de um marcador de spin intercalado em multibicamadas planas, é necessária a obtenção de espectros com o campo magnético orientado paralelo (0°) e perpendicular (90°) à normal à superfície da bicamada. Isto permite a obtenção dos desdobramentos hiperfinos paralelo e perpendicular ($A_{//}$ e $A_{\perp}$, respectivamente) que são empregados para o cálculo de S, como descrito pela equação abaixo:

$$(4) \quad S = \frac{A_{//} - A_{\perp}}{A_{zz} - (A_{xx} + A_{yy})/2}$$

onde A_{zz} é o tensor de desdobramento hiperfino na direção do eixo z (onde se tem a maior probabilidade de se encontrar o elétron desemparelhado) e A_{xx} e A_{yy} são, respectivamente, tensores de desdobramento hiperfino nas direções x e y (que correspondem a valores de desdobramento hiperfino mínimos). Nesta equação (4) todos os valores representam médias do movimento do eixo longo molecular, considerando-se simetria cilíndrica ao redor desse eixo.

O espectro de marcadores de spin em dispersões lipídicas é uma somatória de espectros de todas as orientações possíveis do eixo principal da molécula em relação ao campo magnético aplicado. Apesar da existência de uma distribuição macroscópica isotrópica dos lipídios, o espectro resultante é dependente da ordem local e reflete a orientação local de cada molécula.

O espectro resultante nem sempre permite a determinação de S. Porém, foi demonstrado por HUBELL e McCONNELL (1971) que os espectros de alguns marcadores de spin intercalados em dispersões lipídicas

apresentam pontos dos quais é possível extrair $A_{//}$ e $A_{\perp}$ (Figura 9), o que permite o cálculo de S a partir da equação (4) .

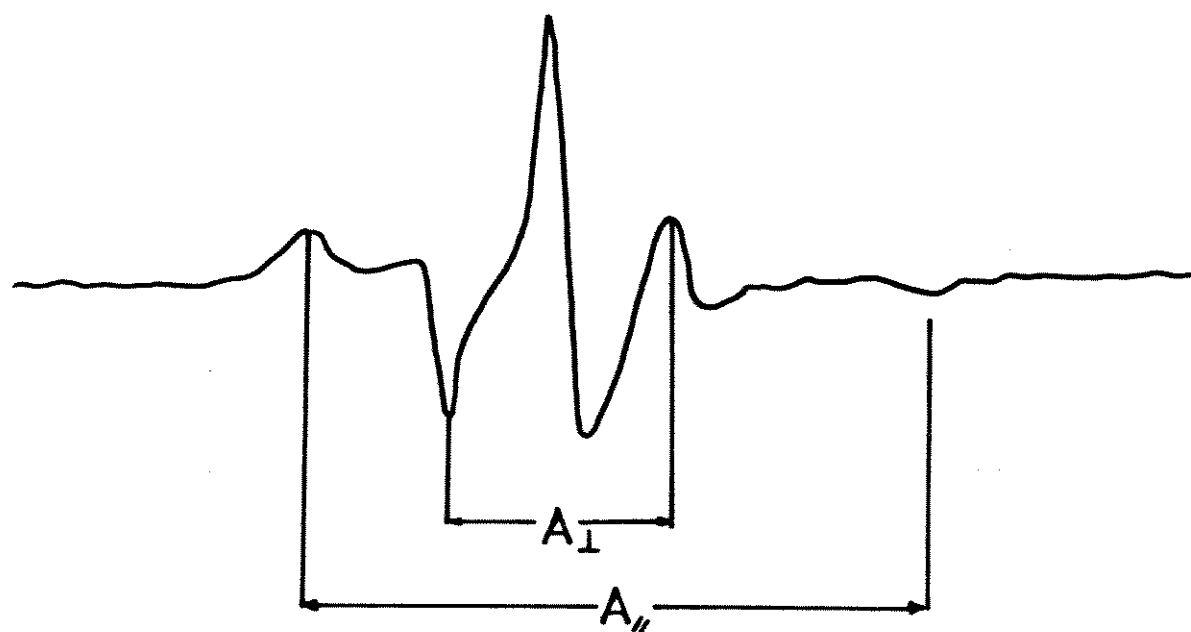


Figura 9. Espectro de RPE do marcador de spin 5-SASL ($1,56 \times 10^{-4}$ M) em lipossomos de fosfatidil colina de ovo (7,8 mM), mostrando as medidas de $A_{//}$ e $A_{\perp}$ (BIANCONI, 1990).

Contudo, existem marcadores de spin que, por apresentarem maior mobilidade em dispersões lipídicas, não possibilitam a determinação precisa dos valores de S e τ_c a partir do espectro de RPE. Nestes casos, pode-se avaliar o grau de organização da membrana a partir da medida de um parâmetro empírico obtido pela relação das alturas das linhas de campo baixo (h_{+1}) e campo médio (h_0), h_{+1}/h_0 (Figura 10) que engloba as contribuições de ordem e mobilidade. Quanto maior esta relação, menor o grau de organização do sistema (SCHREIER et alii, 1978).

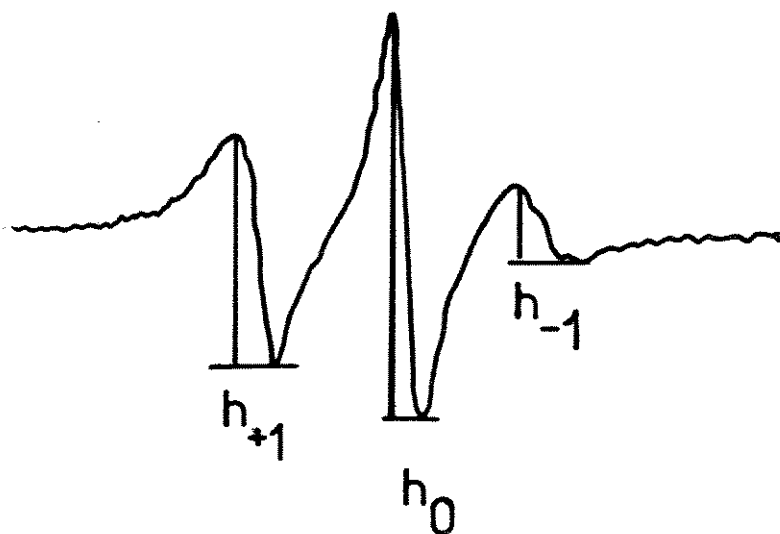


Figura 10. Espectro de RPE do marcador de spin 5-SASL ($1,56 \times 10^{-4}$ M) em lipossomos de fosfatidil colina de ovo (7,8 mM), mostrando as medidas de h_{+1} , h_0 e h_{-1} (BIANCONI, 1990).

2- Difração de Raios-x a baixo Ângulo

A utilização da técnica de difração de raios X na resolução de estruturas biológicas, nos permite determinar a posição dos átomos numa molécula ou estrutura cristalina com uma resolução de aproximadamente 2 Å, através da utilização de métodos matemáticos para o cálculo da distribuição da densidade eletrônica. Porém multicamadas de membranas biológicas, *in situ* ou artificialmente preparadas, não podem ser consideradas sistemas perfeitamente ordenados, como cristais ideais unidimensionais. Em sistemas desse tipo um certo grau de desordem é mantido, mesmo em estruturas mais ordenadas como é o caso da nervo-mielina (BAUROCK e NELANDER, 1976). No caso das membranas naturais, não é possível, portanto, chegar-se a uma localização precisa dos átomos na bicamada. O que pode ser determinado é a sua estrutura interna de baixa resolução.

Este método baseia-se em irradiar uma amostra e obter informações sobre ela a partir da radiação difratada. A radiação difratada pelas membranas naturais ou artificialmente empilhadas, origina um espectro (chamado de espectro de Bragg), já que as bicamadas de fosfolipídios ordenadas apresentam espaçamento bastante regular. Se, por um lado, o arranjo comporta-se como uma estrutura unidimensional, na direção do eixo perpendicular ao plano das bicamadas, por outro lado, as cadeias de carbono arranjam-se numa estrutura lateral que difrata independentemente. A intensidade difratada na região equatorial, permite calcular a distância entre as cadeias de carbono da bicamada. Esta distância varia de 4.5Å a 4.6Å, dependendo da configuração das cadeias

da bicamada (LEVINE, 1972). Desta forma podemos obter informações da estrutura interna das membranas, tanto a partir da difração lamelar (meridional), quanto daquela devida ao empacotamento lateral (na direção equatorial).

Podemos considerar o fenômeno da difração lamelar como os planos das bicamadas moleculares refletindo os raios X e introduzindo diferenças de fase (defasagens da radiação difratada) devido à separação espacial dos mesmos. Estas diferenças de fase introduzidas pela separação espacial devem ser iguais a múltiplos inteiros do comprimento de onda dos raios X, para que os raios difratados surjam na interferência construtiva da radiação difratada (figura 11).

Os diagramas de difração dos arranjos lamelares das membranas são obtidos na região de ângulos pequenos ($\theta < 5^\circ$), denominada região de baixo ângulo. Isto se deve ao fato de a espessura da membrana ser da ordem de algumas dezenas de Angstrons, e o comprimento de onda do raio X utilizado ser muito menor. As reflexões que aparecem no diagrama ocorrem em posições definidas por múltiplos inteiros do inverso do espaçamento lamelar.

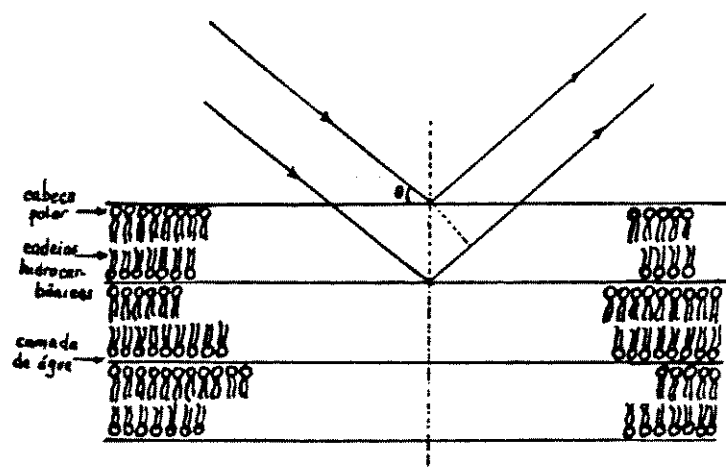


Figura 11. Representação esquemática do sistema difratante de um empilhamento de bicamadas lipídicas. (θ é o ângulo de Bragg).

No caso específico de membranas de eritrócitos ("ghosts") ordenadas, a estrutura lamelar por elas descrita, segundo PAPE e colaboradores (1977), seria equivalente à representação que é mostrada na figura 12. Nesta representação esquemática, temos o sistema difratante, onde define-se tipicamente o espaçamento L , no qual são distintos os espaçamentos L_1 e L_2 . O termo L_1 é relativo a distância intracelular entre duas bicamadas da mesma célula, e L_2 a distância intercelular entre bicamadas de duas células vizinhas no empilhamento. São exatamente esses espaçamentos que podem ser determinados pela difração de raios-X.

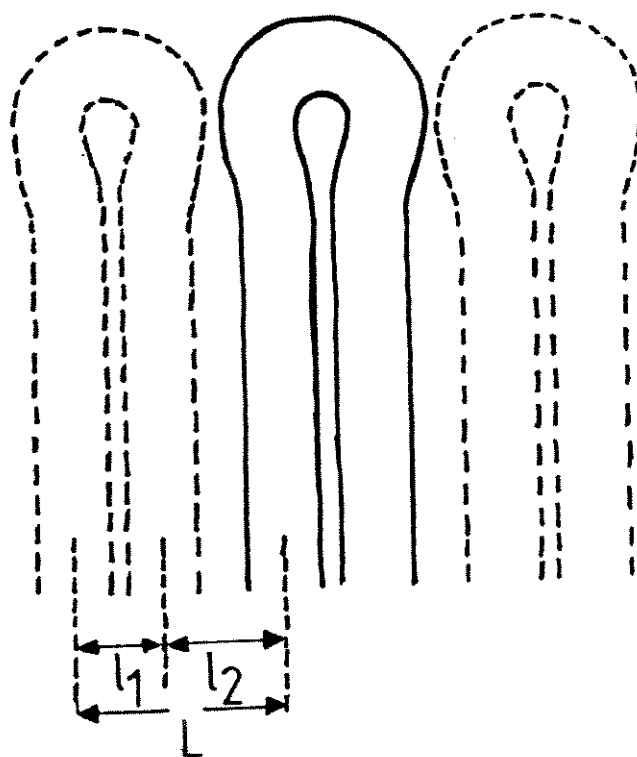


Figura 12. Representação esquemática de "ghosts" empilhados e os espaçamentos (L) por eles definidos (L_1 é a distância intracelular e L_2 a distância intercelular)

D- Objetivos desse estudo

Este trabalho teve como principais objetivos:

1. Averiguar o comportamento bifásico, relacionado ao fenômeno lítico em eritrócitos tratados com um grupo de moléculas anfifílicas (homólogos da série Tween) cujo estudo apresentasse

relevância para pesquisa bioquímica e farmacêutica.

2. Procurar esclarecer a natureza da interação bifásica de moléculas anfifílicas com eritrócitos, principalmente quanto à interação protetora.

3. Detectar as alterações da membrana eritrocitária por técnicas físicas que possibilitassem a avaliação do comportamento bifásico da membrana tratada com os detergentes da série Tween (homólogos 20, 40, 60 e 80).

E- Os compostos estudados

Tendo em vista esses objetivos, iniciaram-se os estudos de alguns detergentes homólogos, não-iônicos, da série Tween.

Os detergentes Tween (veja na seção de materiais e métodos sua estrutura e propriedades) são compostos que apresentam emprego muito variado. Devido a suas propriedades, detergentes não-iônicos com grupos "cabeça" polioxi-etileno, ao contrário da maioria dos detergentes encontrados, usualmente não desnaturam proteínas, podendo dessa forma ser usados para solubilização e caracterização de proteínas de membrana em estado nativo (NEUGEBAUER, 1988). KITANI e FUJIAMA (1981) estudando a enzima ornitina descarboxilase (EC 4.1.1.17) de fígado de rato descreveram que o Tween 80 dava estabilidade à enzima purificada e promovia a sua renaturação caso fosse necessário. WATANABE et alii

(1988), também em um trabalho sobre a purificação de proteínas, demonstraram que o Tween 20 podia prevenir completamente a desnaturação causada por congelamento da miosina de músculo estriado de ratos.

Quanto ao emprego terapêutico e farmacológico dos detergentes Tween, CRISPENS e SORENSON (1988) demonstraram a ação anticarcinogênica do Tween 80 no tratamento do sarcoma de células reticulares de camundongos. PARRIS et alii (1987) demonstraram que o Tween 80, em combinação com algumas drogas quimioterápicas, podia aumentar a atividade citotóxica desses medicamentos *in vitro*. Estudando a ação de uma droga anti-epilética SAMAHA e GADALLA (1987) descobriram que os Tweens 20, 40, 60, 80 e 85 podiam aumentar sua solubilidade e eficácia. Estes detergentes são usados também como agentes estabilizadores para medicamentos injetáveis (SHAKED et alii, 1988) e, em combinação com antibióticos, AL-NAJJAR (1989) demonstrou que eram capazes de reduzir a concentração mínima inibitória de pelo menos quinze antibióticos usados contra infecções cutâneas ocasionadas por *Staphylococcus aureus*.

Além dos estudos realizados com finalidades de pesquisa bioquímica e farmacêutica, como exemplificado acima, existem alguns estudos sobre a aplicação dos detergentes Tween na indústria alimentícia, no combate à poluição e reutilização de recursos, e também no auxílio à agricultura. Os Tween 20 e 60, principalmente, são amplamente usados como aditivos de preparações alimentícias. TAGESON e EDLING (1985) provaram que tais compostos aumentam a permeabilidade do trato intestinal a moléculas potencialmente tóxicas e patogênicas. Quanto ao seu emprego para a utilização de recursos, temos como exemplo

o trabalho realizado por CASTANON e WILKE (1981) sobre a hidrólise enzimática de papel jornal. Neste estudo ficou provado que o Tween 80 aumentava a taxa e a extensão da sacarificação da celulose de forma a aumentar o rendimento e a recuperação da enzima imobilizada. No combate à poluição, os detergentes Tween foram utilizados com sucesso como agentes dispersantes para sanar danos causados por derramamento de óleo no mar (NUNES-GARCIA e VAZQUEZ, 1988). Finalmente, quanto ao emprego desses compostos no auxílio à agricultura, WOODLAND e HODGSON (1987) demonstraram suas propriedades inibitória e estimulante sobre a germinação de sementes de ervas daninhas *in vitro*, dependendo da concentração em que eram empregados.

Face aos inúmeros empregos que os detergentes Tween demonstram ter, surge a relevância dentre outros estudos, de uma investigação mais aprofundada acerca da interação destas moléculas com membranas naturais.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Os detergentes estudados

Tween é o nome comercial que se dá aos detergentes derivados do polioxi-etileno-sorbitol, onde o número de grupos polioxi-etileno é constante (20), variando a composição da cadeia de hidrocarbonetos. Dentro desta série, escolheu-se quatro homólogos para estudo : Tween 20, derivado do ácido láurico (C_{12}); Tween 40, derivado do ácido palmítico (C_{16}); Tween 60, derivado do ácido esteárico (C_{18}) e o Tween 80, derivado do ácido oleico ($C_{18:1}$). A figura 13 mostra a estrutura comum dos detergentes Tween.

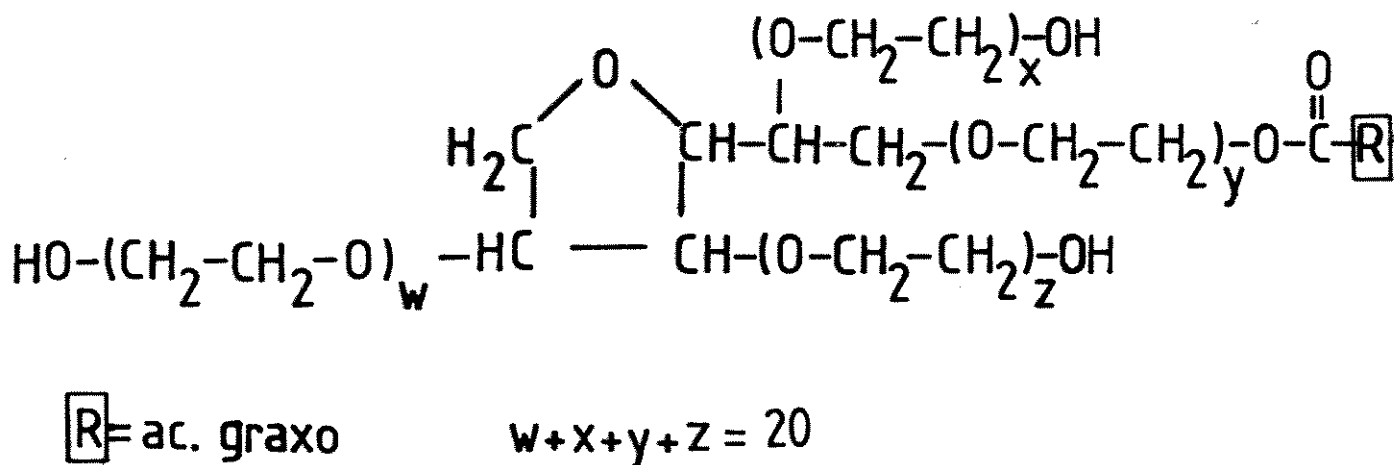


Figura 13. Fórmula estrutural dos detergentes da série Tween

As propriedades físico-químicas dos detergentes Tween estudados neste trabalho são apresentadas na tabela 2.

Propriedades dos detergentes Tween empregados.

Nome	M g/mol ⁻¹	estado e cor (1)	viscosidade (25°) (cst) (1)	HLB (1)	CMC (M) (2)	N (3)
Tween 20	1222	liquido amarelo	330	16,7	$5,9 \times 10^{-5}$	-
Tween 40	1285	liquido amarelo	500	15,6	$2,7 \times 10^{-5}$	-
Tween 60	1295	liquido amarelo	550	14,9	$2,08 \times 10^{-5}$	-
Tween 80	1306	liquido amarelo	425	15,0	$1,0 \times 10^{-5}$	60

(1) LISSANT, 1974.

(2) HELENIUS et alii., 1979.

(3) GENNIS, 1989.

Tabela 2. Algumas propriedades dos detergentes da série Tween estudados (peso molecular médio (MD), estado físico e coloração, viscosidade a 25°C, HLB, CMC e ND).

Os detergentes da série Tween disponíveis comercialmente, em verdade, são misturas de homólogos. No caso do Tween 20, 50% de seus monômeros têm como ácido graxo em sua estrutura o ácido láurico tendo os outros 50% composição variada de ácidos graxos de maior número de carbonos. O Tween 40 tem 90% de ácido palmítico e 10% de ácido esteárico. O Tween 60 tem 55% de ácido esteárico e 45% de ácido palmítico. No Tween 80 encontraremos 75% de seus monômeros contendo

ácido oleico e os outros 25% contendo outros ácidos graxos de cadeias menores (HELENIUS, 1979). Os homólogos 20 e 80 usados foram da Riedel de Haën, e os homólogos 40 e 60 da Sigma. Sempre foram usados os mesmos lotes de detergentes, sem ter sido feita nenhum tipo de purificação.

2-Teste para determinação da autooxidação dos estoques de detergentes Tween

Foi determinada a presença de peróxido nos estoques de detergentes puros através do teste colorimétrico com iodeto de potássio (MERCK STANDARTS, 1972).

Preparou-se uma solução 10 % m/v de KI e a ela adicionou-se uma alíquota (100 μ l) do detergente a 1 % (maior concentração utilizada em todos os testes), na proporção de 1 : 11 (KI : detergente). As soluções 1 % dos detergentes foram preparadas no mesmo dia (25° C), a partir de estoques mantidos no escuro (25°C). Feito isso para cada um dos homólogos, as soluções incolores obtidas foram agitadas e mantidas no escuro por 1 hora. A presença de peróxido é determinada pelo aparecimento de coloração amarelada na solução, devido à oxidação do iodeto a iodo molecular. Se nenhuma cor for detectável, isso significa que, caso exista peróxido, sua concentração é inferior a 0.0003%.

3-Determinação espectrofotométrica da CMC do Tween 80.

A determinação da CMC do Tween 80 nas condições dos ensaios biológicos (37° C, em solução 7.7×10^{-2} M de NaCl) foi realizada pelo método da solubilização de corantes (SHIMIZU e IWATATSURU, 1990).

Utilizou-se o corante SUDAN BLACK (C.I. 26150) da Sigma, insolúvel em água mas solúvel em fases apolares, como indicador da presença de micelas na solução (estrutura na figura 14). Desta forma foram preparadas soluções em concentrações crescentes de detergente de forma a se obter concentrações que estivessem acima e abaixo da CMC determinada em água (temperatura de 25°C) de valor 1.0×10^{-5} M (HELENIUS et alii, 1979). A cada solução de volume final igual a 10 ml foram adicionados 1 mg de Sudan black. As soluções ficaram por um período de 48 horas a 37°C, sendo agitadas em intervalos regulares. Após esse período determinou-se a absorbância do sobrenadante das soluções a 615 nm em espectrofotômetro Beckman DB-G. Os valores de absorbância obtidos foram graficados contra os valores de concentração do detergente. Abaixo da CMC espera-se que não haja solubilização do corante, e portanto que o valor de absorbância das soluções nesta condição seja pequeno e invariável independentemente da concentração do detergente. Acima da CMC, espera-se que com a solubilização do corante nas micelas, ocorra um aumento linear da absorbância com a concentração. Desta forma ocorre uma mudança de comportamento do gráfico, de tal sorte que, traçando-se duas retas pelos valores experimentais obtidos, pela intersecção das duas, determina-se o valor da CMC.

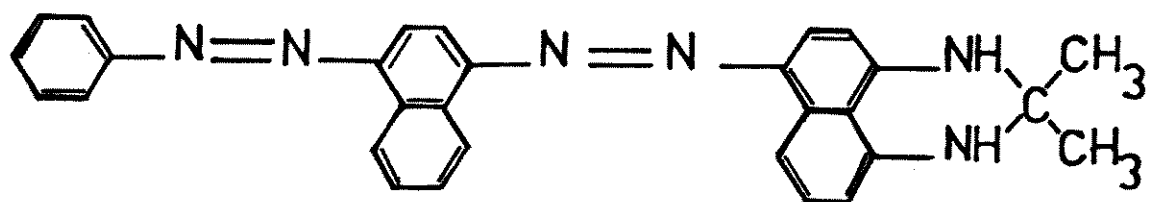


Figura 14. Fórmula estrutural do Sudan Black.

4- Preparação de eritrócitos íntegros e "ghosts"

Trabalhou-se com sangue de ratos de laboratório de linhagem isogênica. O sangue foi coletado em solução anticoagulante (Alsiver) e depois centrifugado a 4°C por 10 minutos a 700 x g. O plasma, células da série branca e gorduras eram removidos por aspiração. As células foram ressuspensas em PBS (NaCl $1,37 \times 10^{-1}$ M, KCl $2,7 \times 10^{-3}$ M, $\text{NaHPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ $8,0 \times 10^{-3}$ M e KH_2PO_4 $1,4 \times 10^{-3}$ M), tampão de osmolaridade e pH fisiológicos, e novamente centrifugadas nas mesmas condições. Após três repetições consecutivas desse processo obtinha-se o concentrado de hemácias que era mantido sob refrigeração (4°C) e usado num período de 24 horas.

Para a obtenção dos "ghosts" (membranas de hemácias isoladas) o preparo do concentrado de hemácias foi um pouco diferente, sendo o pH da solução de lavagem (PBS) elevado para 8.0 e a aspiração da

interface de células brancas e gorduras mais vigorosa, mesmo que assim ocasionando uma perda de maior quantidade de células vermelhas próximas à interface. A aspiração vigorosa foi feita para que se garantisse que a preparação estivesse livre de leucócitos, células ricas em proteases que poderiam comprometer a qualidade do estoque de "ghosts". O preparo dos "ghosts" propriamente dito foi feito segundo o método descrito por DODGE e colaboradores (1963), que se baseia na ruptura hipoosmótica dos eritrócitos com tampão TRIS-HCl 10mM pH 8.0. Feita a ruptura, as membranas foram sucessivamente ressuspendidas neste tampão e centrifugadas por 10 minutos a $20.000 \times g$ a $4^{\circ} C$, ficando depositadas no precipitado e o sobrenadante sendo removido por aspiração. Frequentemente, dependendo do doador (HANAHAN e EKHOLM, 1974) há a formação de um "pellet" insolúvel de coloração avermelhado (devido à maior retenção de hemoglobina), rico em proteases contaminantes que deve ser eliminado. A obtenção de "ghosts" brancos e íntegros depende amplamente da molaridade e pH do tampão de lise (DODGE et alii, 1963). Segundo DODGE e colaboradores, o pH mais elevado auxiliaria na não retenção de hemoglobina pela membrana (daí o emprego de tampão pH 8.0 mesmo para o preparo do concentrado de hemácias).

As condições descritas por DODGE e colaboradores seriam ideais para manter a integridade das membranas (evitar a sua fragmentação) contudo, não seriam suficientes para garantir a obtenção de "ghosts" brancos. Na prática foi exatamente esse o problema que se encontrou, e recorreu-se então a uma modificação do método sugerida por BRANLEY e COLEMAN (1972), incluindo-se uma última lavagem com tampão TRIS 10 mM - EDTA 1 mM, pH 8.0. Uma vez isolados os "ghosts", fez-se uma

dosagem de proteína pelo método de biureto (LAYNE, 1957).

Dependendo da técnica subsequente a ser empregada, os "ghosts" foram mantidos puros e congelados em nitrogênio líquido ou então mantidos no próprio tampão de lise a 4°C. Quando ficavam apenas estocados a 4°C eram usados num período de no máximo 24 horas. Esta técnica de preparo de "ghosts" humanos foi empregada para o preparo de "ghosts" humanos e de ratos, obtendo-se igual rendimento e qualidade. Os "ghosts" humanos não foram usados para nenhum experimento, tendo sido preparados algumas vezes apenas para servirem como padrão de qualidade para os "ghosts" preparados a partir de hemácias de rato.

5- Microscopia dos eritrócitos

Os microscópios de interferência e contraste de fase são microscópicos ópticos modificados para traduzir diferenças de índice de refração, num contraste visível, tanto em brilho quanto em cor, utilizando-se da vantagem do fenômeno de interferência. Isto pode ocorrer quando uma onda atravessa um meio de índice de refração diferente daquele encontrado pela outra onda, de forma que assumam fases contrárias. Usando-se tais efeitos para manipular a luz que passa através de uma célula, ao invés de se manipular a própria célula, alcança-se uma "coloração óptica" de acentuado contraste (NOVIKOFF e HOLTZMAN, 1976).

Fez-se a incubação de 50 µl de suspensão de hemácias (Chematócrito 50%) com 5 ml de solução de NaCl 0,077 M ou em tampão

fosfato de mesma molaridade pH 7,4, e uma alíquota de 100 μ l de uma solução estoque de detergente (5 % m/v) por um período de 15 minutos. Após esse período fez-se a microscopia das soluções num fotomicroscópio Carl Zeiss- II. O preparo das amostras consistiu em colocar-se uma gota da suspensão de hemácias (aproximadamente 5 μ l) entre lâmina e lamínula e subsequentemente fazer-se o exame microscópico nos moldes da microscopia de fase, que baseia-se em diferenças de índice de refração (NOVIKOFF e HOLTZMAN, 1976). Submeteu-se a esses estudos eritrócitos de ratos sem nenhum tratamento (controle), e eritrócitos tratados com os detergentes Tween 20, 40, 60 e 80 na concentração de 0,1 % m/v, ou seja, Tween 20 $8,2 \times 10^{-5}$ M, Tween 40 $7,8 \times 10^{-5}$ M, Tween 60 $7,7 \times 10^{-5}$ M e Tween 80 $7,6 \times 10^{-5}$ M, concentrações próximas da CMC de cada detergente.

6- Testes hemolíticos

O teste hemolítico baseou-se na análise espectrofotométrica da hemoglobina extravasada, segundo metodologia descrita por DACIE e VAUGHAN (1938).

Inicialmente foram feitas curvas de resistência hemolítica de eritrócitos de rato em condições de pH e osmolaridade fisiológica (pH 7,4, 0,154 M NaCl) em concentrações crescentes dos detergentes Tween. Realizou-se também os mesmos testes com hemácias fragilizadas por estresse osmótico e de pH. Após ter sido feita uma curva hemolítica em soluções não tamponadas em gradiente de NaCl, foram escolhidas duas diferentes concentrações (0,082 M e 0,077 M de NaCl, uma delas

(0,077 M correspondendo à metade da osmolaridade fisiológica, e se fez o teste de ação hemolítica dos detergentes Tween. O teste hemolítico consistiu, da mesma forma que para os experimentos analisados pela microscopia, na incubação de 50 μ l de suspensão de hemácias (hematócrito 50%) com 5 ml de solução de NaCl 0,077 M ou 0,082 M (soluções salinas) e 100 μ l das soluções estoque de detergente (0,005 %; 0,05 % e 50 % m/v) por um período de 15 minutos. Foram efetuados também ensaios controle onde não se adicionou detergente, colocando-se em seu lugar, 100 μ l da solução salina. Na sequência fez-se uma centrifugação por 5 minutos a 700 x g e a absorbância do sobrenadante foi determinada em um espectrofotômetro Carl Zeiss (PM QII) a 541nm.

7- Determinação do grau de lipoperoxidação

O grau de peroxidação lipídica das membranas dos eritrócitos tratados com os detergentes Tween, na maior concentração em eles foram usados nos testes hemolíticos (1,0 % m/v), foi determinado pela dosagem da produção de malonildialdeído. Os testes foram realizados de acordo com o método descrito por STOCKS e DORMANDY (1971), e consistiam em se misturar lentamente 1 ml da amostra biológica (no caso, 1 ml do meio hemolítico completo, contendo sangue, solução salina e detergente tal qual feita para a realização dos testes hemolíticos, após os 15 minutos de incubação) com 2 ml de uma solução de TCA-TBA-HCl (ácido tricloroacético 15% m/v, ácido tiobarbitúrico 0,375% m/v e ácido clorídrico 0.25N). Foram feitos também ensaios controle, onde no

primeiro não se adicionou detergente (controle-sangue) e no segundo não se adicionou sangue (controle-detergente). No terceiro e quarto ensaios controle adicionou-se, no lugar dos detergentes, peróxido de hidrogênio, nas concentrações finais de respectivamente 2 e 5 mM (controles-positivos). O quinto ensaio controle continha apenas a solução de TCA-TBA-HCL (controle-branco). O TBA forma cromóforos com o malonildialdeído (MDA), produto secundário da lipoperoxidação, que então são determinados espectrofotometricamente (CHIU et alii, 1982). As soluções obtidas foram aquecidas por 15 minutos, em banho maria. Feito isso, as soluções foram resfriadas em banho de gelo por alguns minutos, e o precipitado floculoso removido por centrifugação a $1000 \times g$ por 10 minutos. A absorbância dos sobrenadantes das amostra foi determinada a 535 nm (espectrofotômetro Carl Zeiss PM QII), descontando-se o valor da absorbância do tubo controle-branco. A concentração das amostras em nmol de MDA por ml de hemácias foi determinada usando um coeficiente de absorção molar de $1,56 \times 10^5 M^{-1} cm^{-1}$ (STOCKS e DORMANDY, 1971). Os ensaios feitos com os detergentes foram realizados na presença e na ausência de azida de sódio (0,025 mM, um inibidor da catalase, enzima que tem a capacidade de degradar o peróxido de hidrogênio. Os controles-positivos foram sempre feitos em solução que continha azida.

8- Determinação eletroforética do padrão proteico de "ghosts" tratados com os detergentes Tween

Para esse estudo foram utilizados "ghosts" de eritrócitos

de ratos preparados conforme descrito anteriormente, (tendo eles sido congelados ou não em nitrogênio líquido). Em seguida executou-se o mesmo procedimento usado para os testes hemolíticos, tratando-se os "ghosts" em solução de NaCl 0,077 M (a 37°C, por 15 minutos) com os detergentes Tween na concentração em que cada um deles mostrou efeito protetor ao estresse osmótico em hemácias, só que, substituindo-se as células intactas por um volume equivalente de "ghosts" (uma vez que "ghosts" reselados mantêm praticamente o mesmo volume que o das células de origem). Na sequência, após os 15 minutos de incubação, foi feita uma centrifugação por 10 minutos a 20.000 x g. O volume de cada amostra aplicado nas placas de eletroforese foi de 100 µl, sendo a concentração proteica igual a 3mg/ml.

Escolheu-se o sistema de placa de gel de poliacrilamida -SDS utilizando-se a metodologia descrita por HAMES e RICKWOOD (1981). Nesse método utiliza-se um tampão de corrida 0,25 M TRIS- 1,92 M glicina- 1% SDS e um tampão de amostra 0,08 M TRIS- 2% SDS- 10% glicerol- 0,2% azul de bromofenol. Utilizou-se um gel de empacotamento 5% m/v e um gel de corrida 10% m/v. Preparada a placa, a amostra foi reduzida com ditiotreitol 0,1 M (concentração final no tampão), fervida em seu tampão por 5 minutos e então aplicada na placa de eletroforese. A coloração do gel foi feita pelo método do "coomasie blue" (C.I. 13390) descrita por LAMMLI (1970), que utiliza uma mistura de metanol- ácido acético - "coomasie blue" para coloração e de metanol- ácido acético para descoloração. O gel foi imerso nestas soluções o tempo necessário para que atingisse a coloração adequada (cerca de 10-15 horas).

9- Estudos de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

Os experimentos que envolveram o emprego dessa técnica foram realizados apenas com o Tween 80 (monooleato) utilizando-se o marcador de spin derivado do ácido esteárico 5-SASL da Syva, Palo Alto (figura 15) numa concentração de no máximo 2 mol% do conteúdo total de lipídios da membrana. Os experimentos consistiram em estudar espectroscopicamente o comportamento de soluções de eritrócitos tratados em diferentes concentrações do detergente ($7,6 \times 10^{-6}$ M; $7,6 \times 10^{-5}$ M; $7,6 \times 10^{-4}$ M; $7,6 \times 10^{-3}$ M e $7,6 \times 10^{-2}$ M). Todos os ensaios foram feitos em solução salina (NaCl $7,7 \times 10^{-2}$ M) com hematócrito 50% (correspondente a uma concentração molar de lipídios totais da membrana de aproximadamente $4,35 \times 10^{-3}$ M).

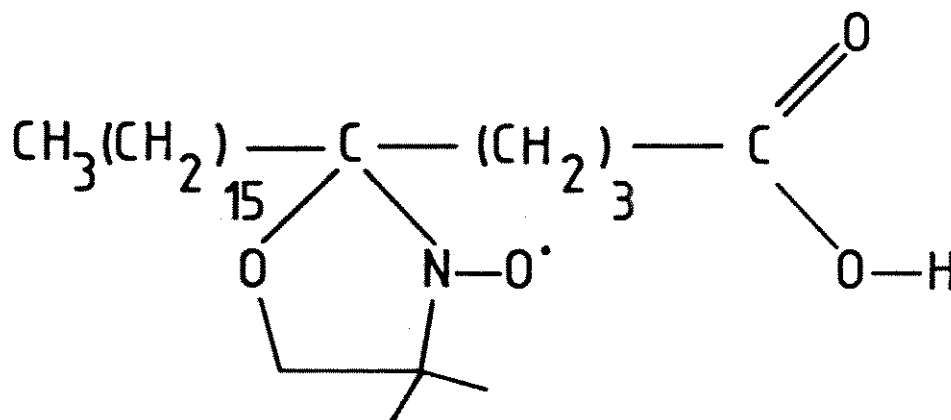


Figura 15. Fórmula estrutural do marcador de spin 5-SASL.

Os ensaios consistiram das seguintes etapas:

1- Preparo de filme de marcador:

Colocou-se um volume de marcador dissolvido em clorofórmio (suficiente para que sua concentração final fosse de, no máximo, 2.mol% da quantidade de lipídios totais da membrana, correspondentes no caso, a 5.0×10^{-5} M). Este então foi evaporado em fluxo de nitrogênio. Estes filmes foram preparados no mesmo tubo onde seriam mais tarde acrescentados a solução salina e o detergente, ou salina/eritrócitos/detergente ou, ainda, só salina e eritrócitos. Antes, porém, os tubos foram mantidos sob vácuo por 2 horas para garantir a total evaporação do solvente.

2-Preparo das amostras:

Adicionou-se aos tubos com filme de marcador a solução salina $7,7 \times 10^{-2}$ M, depois o detergente (exceto no tubo controle) e agitou-se vigorosamente (em agitador) por 5 minutos. Adicionou-se o mesmo volume de sangue (para que o hematócrito das amostras fosse 50%) e incubou-se a solução por 30 minutos a 37°C sob agitação suave e constante.

3-Obtenção de espectros de RPE:

Foram registrados espectros da amostra total, e no caso dos ensaios que levavam células, após uma centrifugação de 10 minutos a 700 g, foram registrados espectros do precipitado e do sobrenadante também. O aparelho usado foi um ER 200-SRC da Brucker, e os espectros nele registrados, todos obtidos a 37°C .

4-Medida da absorbância do sobrenadante:

A análise do sobrenadante dos ensaios que levavam células foi feita para fazer um paralelismo entre os efeitos do detergente detectáveis pela concentração de hemoglobina extravasada com os efeitos acompanhados pela sonda paramagnética. Utilizou-se um espectrofotômetro DMS-100 (Intralab) e as medidas foram feitas em 541 nm.

5-Determinação de fosfato dos sobrenadantes e precipitados

Fez-se uma dosagem de fosfato utilizando o método proposto por ROUSER e colaboradores (1970) nos sobrenadantes e precipitados das soluções tratadas com diferentes concentrações de Tween 80 analisadas por RPE. Para a determinação, primeiro fez-se uma curva padrão (em que se determinou concentrações de 10 a 60 nmolar de fosfato) a partir de uma solução estoque 1 mM de fosfato de sódio, da qual se retiraram 10, 20, 30, 40, 50 e 60 μ l. Das amostras retiraram-se volumes adequados que fornecessem concentrações entre 10 e 60 nmolar de fosfato.

Após secagem em estufa, as amostras foram digeridas com 50 μ l de ácido perclórico concentrado por um período de no mínimo 1 hora em placa de aquecimento a 180°C. À amostra e aos padrões secos, adicionou-se 900 μ l do reagente (3,3 mg de molibdato de amônia - 749 μ l de água bidestilada- 21,7 μ l de ácido sulfúrico concentrado- 12,93 mg de ácido ascórbico em 129,30 μ l de água, por tubo) e manteve-se a 45°C por 20 minutos. Após a reação, mediu-se a absorbância a 795 nm.

Nos experimentos de RPE, trabalhou-se com hematócrito 50% para respeitar as proporções marcador/lipídio (2 mol%) e ao mesmo

tempo obter um bom sinal (dentro da faixa de sensibilidade do aparelho usado, correspondendo a aproximadamente concentrações da ordem de 10^{-5} a 10^{-6} M de marcador). Desta forma, para que fossem mantidas as mesmas proporções detergente/membrana dos ensaios hemolíticos (cujos hematócritos eram de 0.5%), as concentrações do Tween 80 foram corrigidas na mesma proporção (tabela 3). As medidas de absorbância destes ensaios foram feitas exatamente para averiguar a manutenção dos efeitos anteriormente observados em hematócrito menor.

Correção dos valores de concentração do Tween 80 para Ht50x

ensaio	conc. Tween 80 Hto,5% (M)	conc. Tween 80 Ht50x(M)
1 (controle)	0	0
2	$7,6 \times 10^{-8}$	$7,6 \times 10^{-6}$
3	$7,6 \times 10^{-7}$	$7,6 \times 10^{-5}$
4	$7,6 \times 10^{-6}$	$7,6 \times 10^{-4}$
5	$7,6 \times 10^{-5}$	$7,6 \times 10^{-3}$
6	$7,6 \times 10^{-4}$	$7,6 \times 10^{-2}$

Tabela 3. Correção das concentrações de Tween 80 do hematócrito usado para os testes hemolíticos (0,5 %) e para os experimentos de RPE (50 %). A correção do hematócrito foi feita para que a concentração de lipídios nos experimentos de RPE fosse suficiente para elevar a concentração de marcador de spin para a faixa de sensibilidade do aparelho (a concentração de marcador deve ser de no máximo 2 mol% da quantidade de lipídios totais da membrana o que deve levar a uma concentração final de no mínimo 10^{-6} M de marcador, para ser detectável pelo aparelho usado). Para se manter a mesma proporção entre o número de células e a quantidade de detergente, na medida em que se aumentou o hematócrito, aumentou-se também a quantidade de detergente conforme é mostrado acima.

10-Estudos de difração de raios X a baixo ângulo

Nestes estudos buscou-se comparar o padrão de difração de raio X obtido por "ghosts" de ratos empilhados artificialmente (por ultracentrifugação e desidratação) tratados com o homólogo 60, com o padrão obtido por "ghosts" de rato sem nenhum tratamento, submetidos à mesma preparação. Os "ghosts" de rato foram obtidos como descrito no item 4 de materiais e métodos. Para o empacotamento, eles eram ressuspensos em tampão 12% sorbitol-Tris-EDTA (20 mM Tris, 1mM EDTA, pH 7.4) e centrifugados por uma hora a 150.000 x g em uma ultracentrifuga Beckman LB-80M. Antes do seu empacotamento, os "ghosts" sofrem a ação do detergente, da mesma forma que para os experimentos de eletroforese (item 7 do materiais e métodos). O "pellet" de "ghosts" obtido por esse processo era então montado no porta amostras do aparelho de raios-X. Essa montagem consistia em se colocar uma gota (aproximadamente 20 μ l) de uma mistura de 80% "ghosts" e 20% tampão Tris 5mM sobre um substrato de vidro curvo e deixá-la secar vagarosamente em ambiente de umidade controlada (70 %). Desta forma, pode-se obter um empilhamento ordenado de ghosts (PAPE et alii, 1977) com o qual deu-se prosseguimento aos estudos de difração propriamente ditos. Para os cálculos de densidade eletrônica o fator de desordem da amostra é considerado, uma vez que se trata de um sistema lamelar.

As amostras depositadas em substrato de vidro, depois de secas, são colocadas no porta amostras. A figura 16 mostra o porta amostras e o substrato de vidro com uma amostra sendo tangenciada a baixo ângulo pelo feixe de raios X. Como pode-se ver o substrato de

vidro é curvo exatamente para possibilitar o tangenciamento da amostra sem que o mesmo interfira nesse processo. Essa curvatura deve ser considerada e corrigida quando os cálculos da densidade eletrônica da amostra forem feitos.

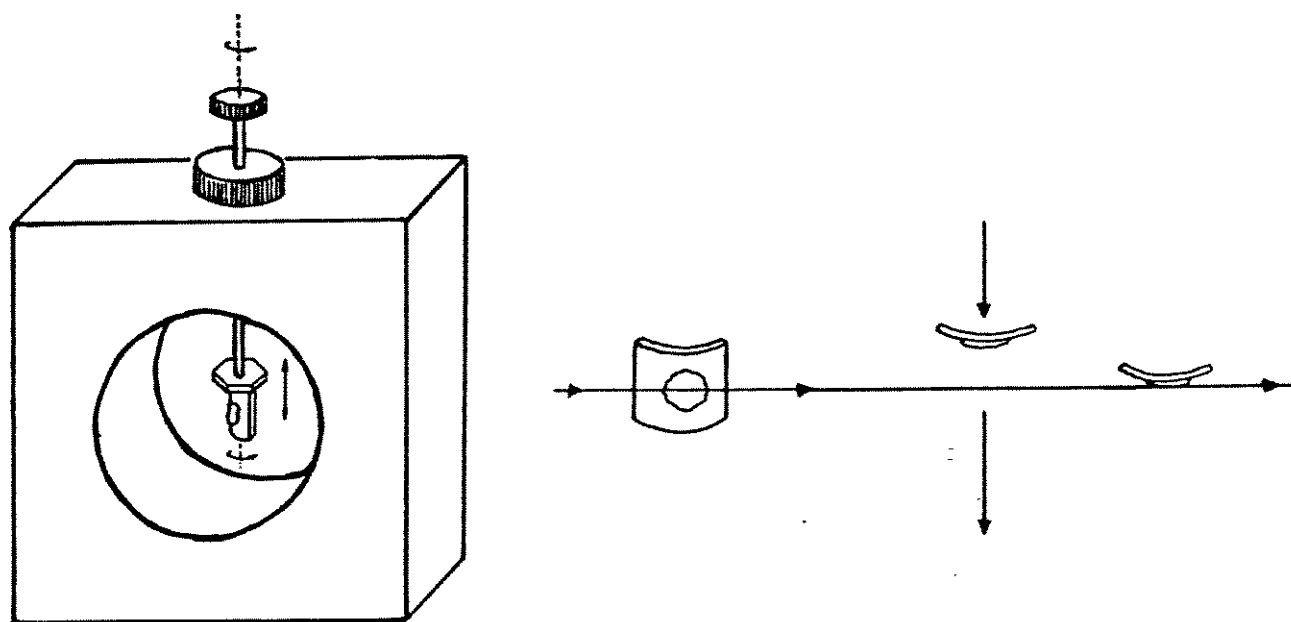


Figura 16. Representação esquemática do porta amostras utilizado para os experimentos de difração de raios-X. Ao lado é representado o tangenciamento da amostra pelo feixe de raios-X.

Os padrões de raios X foram obtidos numa câmara plana com colimação linear e radiação $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda = 1.54 \text{ \AA}$) produzida por um gerador de ânodo rotatório (Rotaflex) da Rigaku-Denki. A geometria do sistema é mostrada esquematicamente na figura 17. As exposições duravam de 8 a 10

horas e nesse período a umidade das amostras era mantida constante por um fluxo de nitrogênio gasoso que passava por uma solução de salinidade adequada.

Os diagramas de difração foram obtidos por método fotográfico, usando o filme Kodak - AA - Industrex, de grão fino.

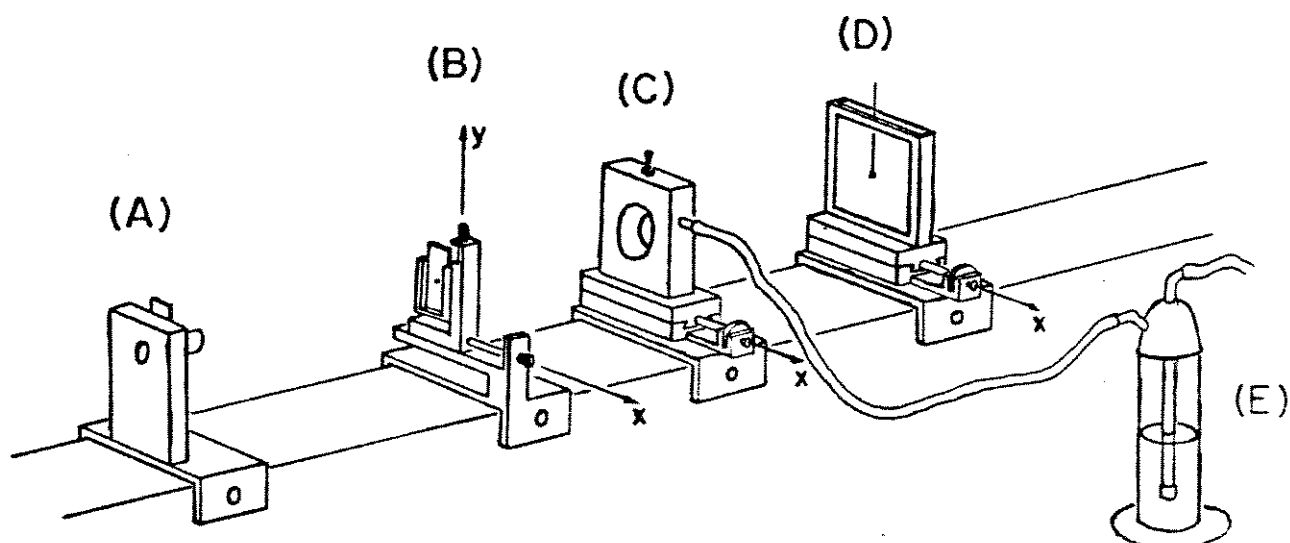


Figura 14. Representação esquemática do sistema utilizado para a irradiação da amostra pelos raios-X. (A) primeira fenda colimadora, (B) segunda fenda colimadora, (C) porta amostras, (D) porta filme, (E) frasco lavador (para umidificação)

RESULTADOS

1- Teste para determinação da auto-oxidação dos detergentes

Não foi constatado visualmente o aparecimento de cor na reação dos detergentes Tween com KI, em nenhum dos testes efetuados em intervalos de 3 meses. Isso indicou que, durante o período em que ficaram estocados, os estoques de detergentes não sofriam auto-oxidação nas condições em que eram mantidos (no escuro, a 25°C). Durante todos os experimentos sobre a ação dos detergentes Tween, os frascos estoques foram sempre mantidos nas mesmas condições de estocagem.

2-Determinação Espectrofotométrica da CMC do Tween 80

O objetivo de se determinar a CMC foi o de avaliar se as condições experimentais de ensaio (temperatura, concentração de NaCl) que seriam usadas em experimentos subsequentes causavam uma variação significativa no valor dessa propriedade nos detergentes usados em relação ao valor obtido em água, a 25°C (HELENIUS et alii, 1979).

Muitos métodos são usados para medir a CMC, todos eles

utilizando-se de mudanças em uma propriedade mensurável do sistema. Como exemplos de métodos de determinação da CMC temos o da tensão superficial, o de espalhamento de luz e o método da solubilização de corantes (ATTWOOD e FLORENCE, 1983). A descontinuidade no gráfico da propriedade medida em função da concentração do detergente corresponde à CMC do surfatante. CAREY (1983) e MUKERJEE e MYSELS (1970) revisaram os principais métodos usados para determinação de CMCs. Ambas as revisões enfatizam que métodos diferentes de detecção de micelização apresentam diferente sensibilidade e portanto podem fornecer diferentes valores de CMC para o mesmo detergente. Além disso, diferentes procedimentos matemáticos e gráficos utilizados para se determinar a CMC, mesmo que de um mesmo experimento, podem fornecer mais de uma estimativa para esse valor (MUKERJEE e MYSELS, 1970). Assim sendo, MYSELS e MUKERJEE (1979) sugerem que seja usada a intersecção das regiões quase lineares acima e abaixo do ponto de quebra como valor da CMC, particularmente nos casos em que o conjunto dos pontos graficados de propriedade física contra concentração de detergente é não-linear. De maneira nenhuma isso elimina a ambiguidade dos valores de CMC, uma vez que o resultado da extrapolação depende da faixa de pontos tomados acima e abaixo de CMC. Finalmente não se deve esquecer de que, para alguns surfatantes, a CMC observada depende muito fortemente das condições experimentais como temperatura, pH e força iônica.

A tabela 4 mostra os valores de absorbância, a 615 nm, obtidos para soluções com concentrações crescentes do detergente Tween 80 a 37°C em solução de NaCl $7,7 \times 10^{-2}$ M, pelo método da solubilização do Sudan Black. A determinação gráfica da CMC é mostrada na figura 18.

Como pode ser observado existe claramente uma mudança de comportamento no gráfico, a partir da qual foi encontrado um valor de $0,9 \times 10^{-5} \text{ M}$ ($11,75 \times 10^{-3} \text{ g/l}$) para a CMC do Tween 80.

Determinação da CMC do Tween 80.

Volume Tween80 $5,13 \times 10^{-4} \text{ M}$	Volume água bidestilada	Conc. _f Tween80 (CM)	Abs _{615nm}
0	10,0	0	0,013
0,05	9,95	$0,25 \times 10^{-5}$	0,012
0,1	9,90	$0,51 \times 10^{-5}$	0,014
0,2	9,80	$1,02 \times 10^{-5}$	0,021
0,3	9,70	$1,60 \times 10^{-5}$	0,040
0,4	9,60	$2,05 \times 10^{-5}$	0,058
0,5	9,50	$2,56 \times 10^{-5}$	0,083
0,6	9,40	$3,07 \times 10^{-5}$	0,086
0,8	9,20	$4,10 \times 10^{-5}$	0,144

Tabela 4. Soluções para medida de absorbância do Tween 80 com 1 mg de Sudan Black a 37°C , em solução $7,7 \times 10^{-2} \text{ M}$ de NaCl.

Determinação da CMC do Tween 80 pelo
método da solubilização do Sudan black

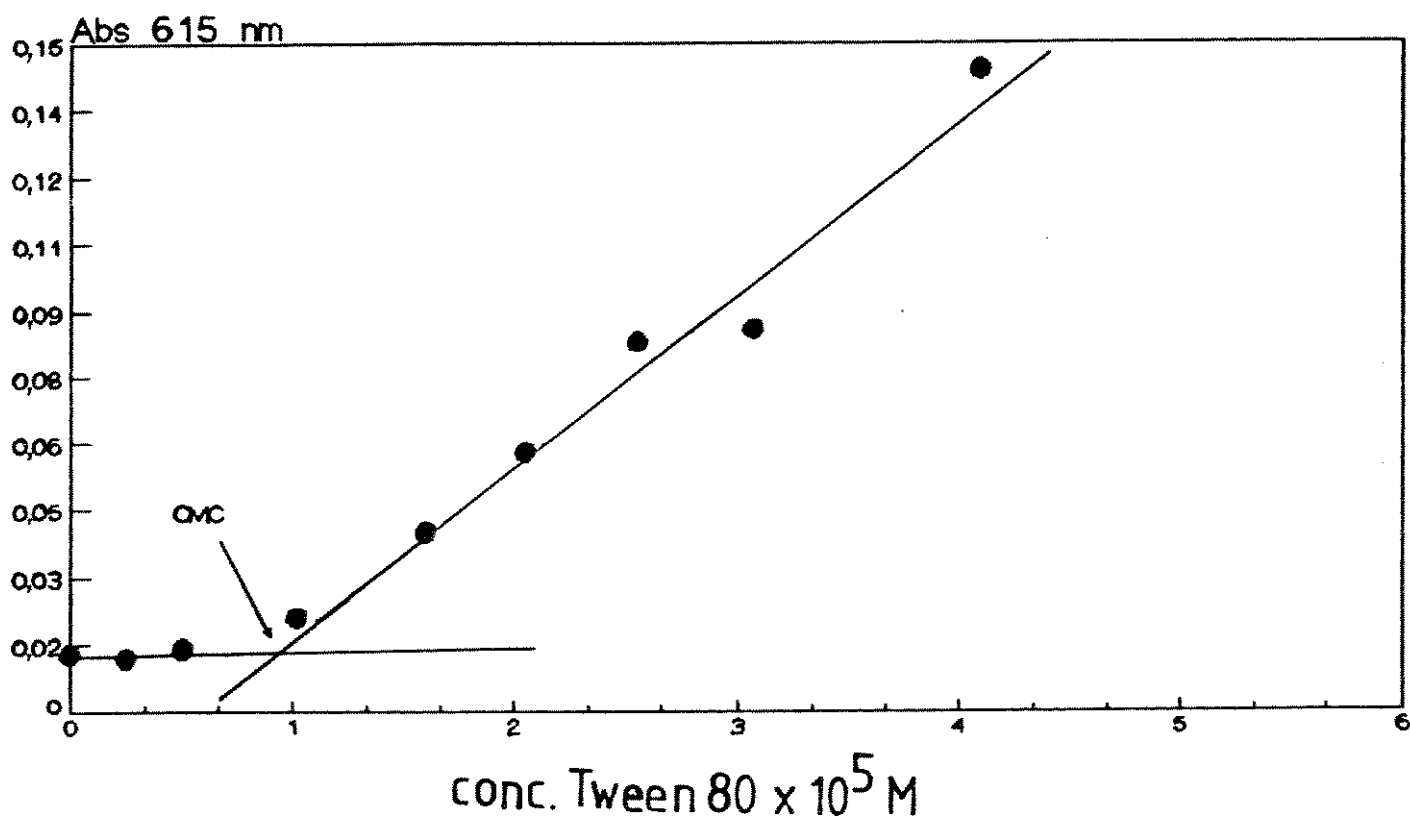


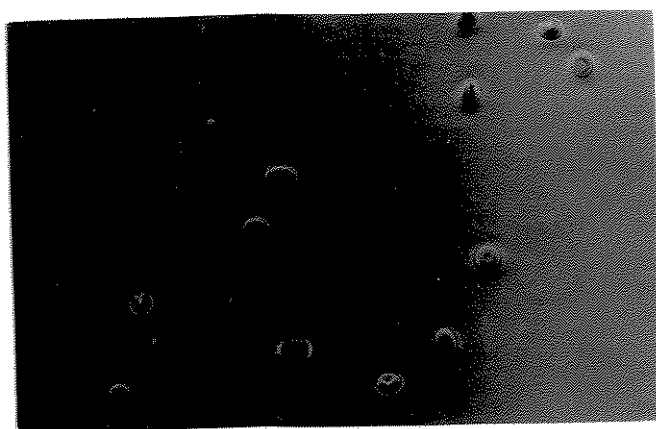
Figura 18. CMC do detergente Tween 80 obtida pelo método da solubilização de corantes, a 37°C em meio de NaCL 0,077 M. O corante utilizado foi o Sudan Black.

3-Microscopia dos eritrócitos

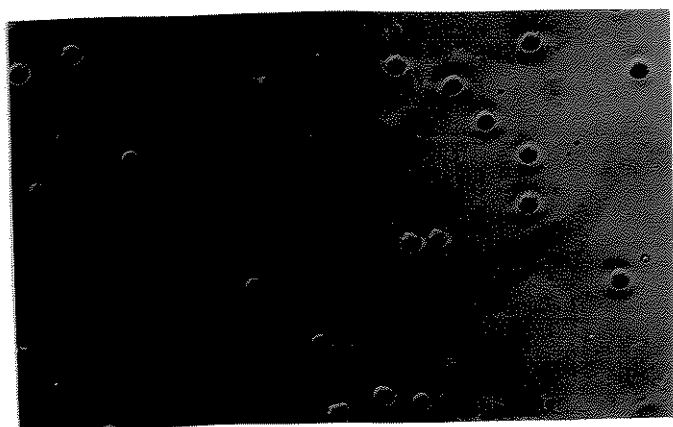
De acordo com o padrão morfológico imposto pelas condições osmóticas do meio em que a célula se encontra bem como da sua interação com agentes que possuam a capacidade de penetrá-la, como tipicamente ocorre com agentes anfifílicos (FUJI, 1979), os detergentes Tween apresentaram dois padrões básicos de modificação das membranas eritrocitárias, tendo sido estes, a formação de espículas na célula (célula crenada) ou de invaginações (célula "cup form"). Quando o meio de ensaio utilizado foi o não tamponado, a forma assumida pelos eritrócitos, independentemente do detergente usado, foi a do tipo crenada. Quando em meio tamponado (pH fisiológico) a forma assumida para os quatro detergentes testados, foi a "cup form". A figura 19a mostra o padrão esférico (obtido por células controle em meio hipoosmótico não tamponado), 19b o padrão ligeiramente discóide (assumido por células controle em meio hipoosmótico em pH fisiológico), 19c exemplo da forma crenada (no caso ocasionada pelo tratamento com o Tween 80 em meio não tamponado) e 19d exemplo da forma "cup form" (no caso também ocasionado pelo tratamento com Tween 80, só que em meio tamponado).



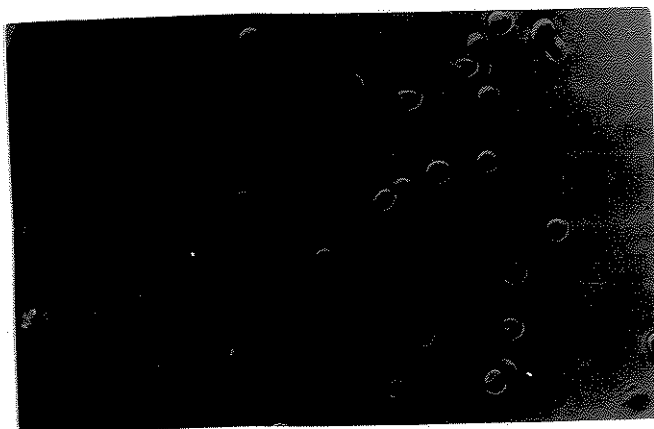
(A)



(B)



(C)



(D)

Figura 19. Fotomicrografias de eritrócitos de ratos (ampliados 500 vezes) realizadas num fotomicroscópio Carl Zeiss II. Observa-se as mudanças nas formas dos eritrócitos induzidas pela interação com os detergentes Tween. (A) controle em solução hipotônica (NaCl 0,077 M não tamponada; (B) controle em solução hipotônica tamponada (tampão fosfato 0,077 M, pH 7,4); (C) célula crenada após o tratamento com o Tween 80 ($7,6 \times 10^{-5}$ M em meio hipotônico não tamponado; (D) célula "cup form" após tratamento com Tween 80 ($7,6 \times 10^{-5}$ M em meio hipotônico tamponado, pH 7,4.

4- Testes hemolíticos

Em condições de pH e osmolaridade fisiológica (pH 7.4, 0,154 M NaCl) utilizando-se concentrações crescentes dos detergentes Tween, nenhum efeito (seja ele de proteção ou promoção da hemólise) foi observado. Desta forma realizou-se os mesmos testes com hemácias fragilizadas por estresse osmótico e de pH condições estas em que outros autores já haviam demonstrado a existência de um comportamento bifásico de outros anfifílicos (TRAGNER e CSORDAS, 1987).

O gráfico da figura 20 mostra a curva de resistência hemolítica de hemácias de rato em solução de NaCl nas concentrações (MD : 0,017; 0,034; 0,062; 0,067; 0,072; 0,077; 0,082; 0,087; 0,092; 0,097 e 0,154, em que o valor 0,154 M de NaCl corresponde à concentração fisiológica (0.9% m/v). A partir desta curva escolheram-se duas concentrações correspondendo a níveis de hemólise intermediários, para que pudessem ser visualizadas alterações (aumento ou diminuição) nesses valores ocasionadas pelo tratamento com os detergentes testados. Estes testes foram sempre feitos a 37°C em meio não tamponado e as concentrações escolhidas foram 0.077 M (0.45% m/v) e 0.082 (0.48% m/v) as quais, nas condições experimentais usadas, causavam respectivamente os valores médios de 32,1 % e 9,7 % de hemólise.

Curva de resistência hemolítica de
hemácias de rato em gradiente de NaCl

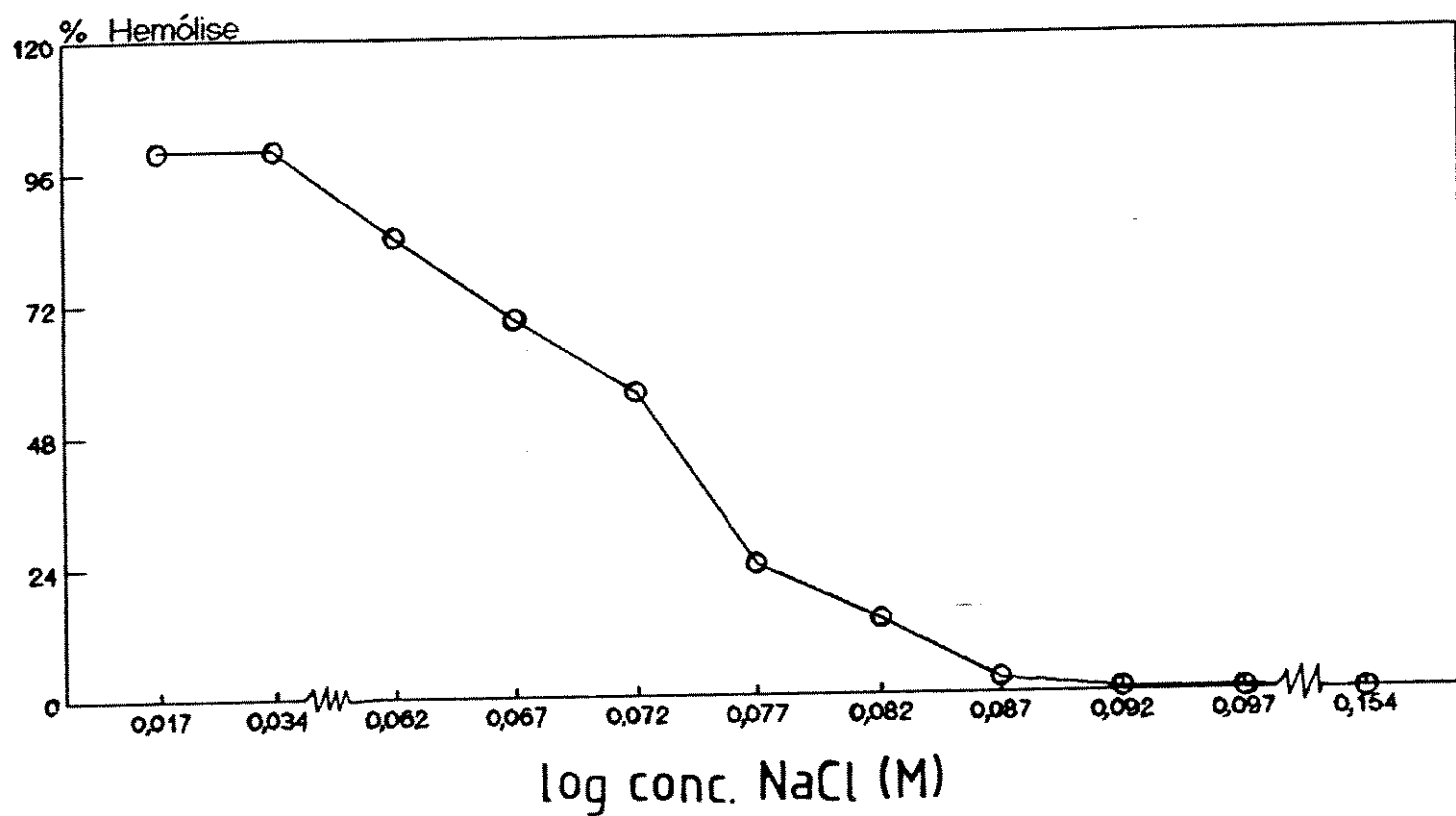


Figura 20. Curva de resistência hemolítica de hemácias de rato em gradiente de NaCl a 37°C.

Os gráficos 21a, 21b, 21c e 21d mostram o efeito dos detergentes Tween em hemácias de rato em meio não tamponado em soluções 0.077 M e 0.082 M de NaCl. Como pode ser observado nos quatro gráficos, a concentração dos Tweens foi variada de forma a se determinar duas concentrações em que claramente havia diferença de comportamento, ou seja, proteção e aumento da hemólise (comportamento bifásico), em relação a um controle obtido para a mesma concentração. As concentrações dos detergentes em % m/v foram as mesmas em todos testes : 0.0001 %, 0.001% e 1%, e a correspondência em concentração molar para cada homólogo é apresentada na tabela 5. Como pode ser observado, os homólogos 40, 60 e 80 apresentaram efeito protetor quando empregados na concentração de 0,0001 % m/v enquanto que tal efeito foi ocasionado pelo o homólogo 20 quando este foi empregado na concentração de 0,001 % m/v. Verifica-se também que todos os homólogos apresentam caráter hemolítico a partir da concentração de 1 % m/v.

Concentrações de detergentes testadas

concentração em m/v	concentração molar			
	Tween 20	Tween 40	Tween 60	Tween 80
0,0001 %	$8,2 \times 10^{-7}$	$7,8 \times 10^{-7}$	$7,7 \times 10^{-7}$	$7,6 \times 10^{-7}$
0,001%	$8,2 \times 10^{-6}$	$7,8 \times 10^{-6}$	$7,7 \times 10^{-6}$	$7,6 \times 10^{-6}$
1,0 %	$8,2 \times 10^{-4}$	$7,8 \times 10^{-4}$	$7,7 \times 10^{-4}$	$7,6 \times 10^{-4}$

Tabela 5. A concentração em porcentagem de peso e volume (m/v) para os detergentes Tween testados foi a mesma, e acima temos as equivalências em molaridade desses valores.

Efeito bifásico dos Tween em hemácias

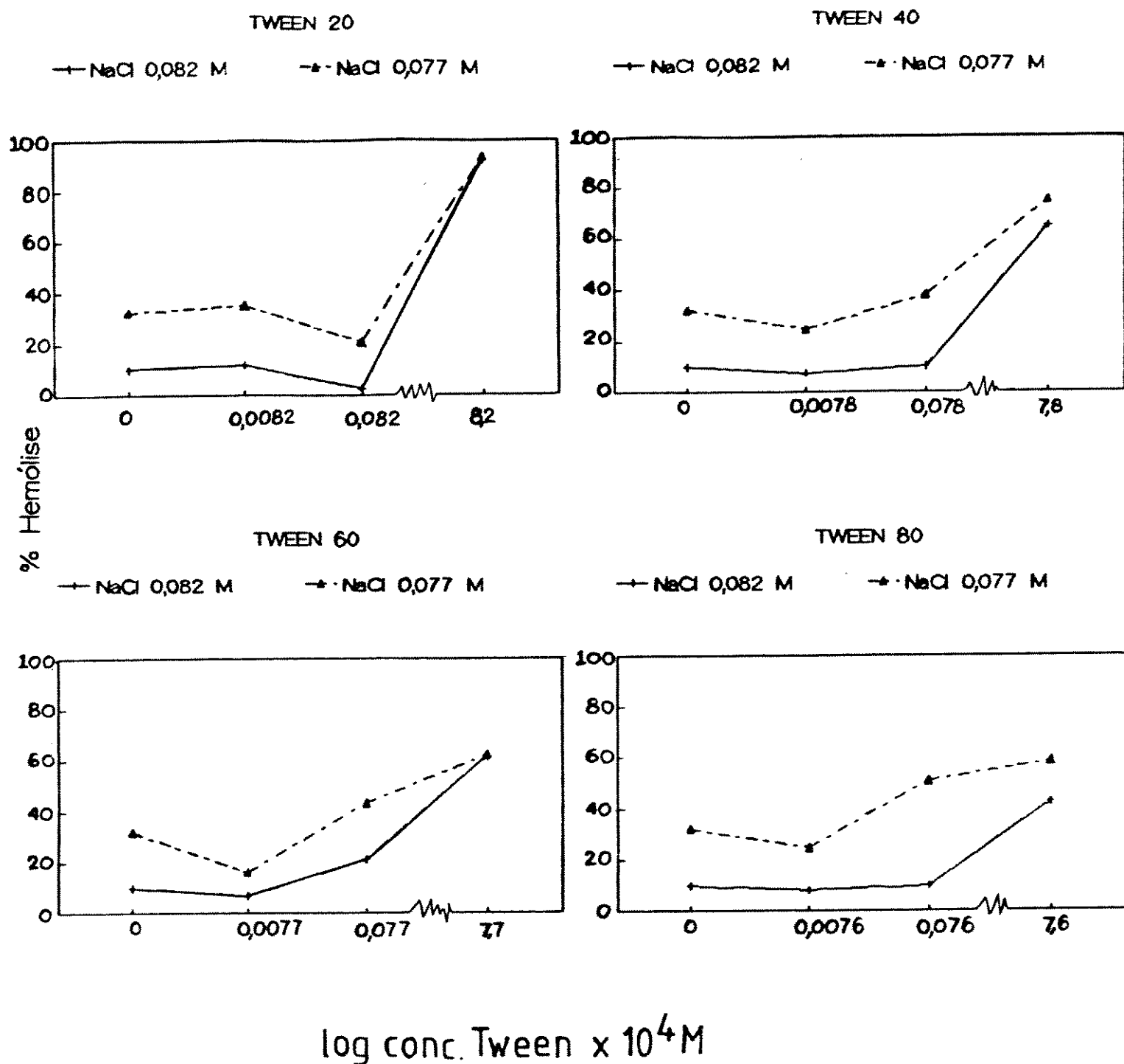


Figura 21. Efeito da concentração dos detergentes Tween em hemácias de rato em duas concentrações diferentes de NaCl (0,077 M e 0,082 M) a 37°C. (A) Tween 20; (B) Tween 40; (C) Tween 60; (D) Tween 80.

A tabela 6 compara os valores de porcentagem de hemólise dos controles nas soluções de NaCl 0,077 M e 0,082 M, com os quatro detergentes homólogos nas concentrações testadas.

Efeito de diferentes concentrações de Tween na porcentagem de hemólise

	conc. (M)	% HEMOLISE NaCl 0,082M	% HEMOLISE NaCl 0,077M
controle	-	9,70	32,10
Tween 20	$8,2 \times 10^{-7}$	11,60	34,70
	$8,2 \times 10^{-6}$	2,30	20,40
	$8,2 \times 10^{-4}$	92,20	93,20
Tween 40	$7,8 \times 10^{-7}$	7,20	24,40
	$7,8 \times 10^{-6}$	9,70	37,70
	$7,8 \times 10^{-4}$	64,50	74,70
Tween 60	$7,7 \times 10^{-7}$	6,60	16,00
	$7,7 \times 10^{-6}$	21,20	43,50
	$7,7 \times 10^{-4}$	62,00	62,50
Tween 80	$7,6 \times 10^{-7}$	8,00	24,70
	$7,6 \times 10^{-6}$	9,90	32,50
	$7,6 \times 10^{-4}$	42,60	58,10

Tabela 6. Hemólise causada pelos detergentes Tween em hemácias de ratos em soluções de NaCl 0,077 M e 0,082 M, a 37°C. Cada detergente foi testado em três diferentes concentrações, 0,001 %, 0,001 % e 1,0 % m/v.

Como pode-se observar na tabela acima, nas duas concentrações de NaCl testadas, as concentrações em que cada homólogo demonstrou comportamento protetor ou hemolítico foram as mesmas, sendo que, como comentado a pouco, o Tween 20 foi o único homólogo que

apresentou concentração de efeito protetor de valor diferente dos demais.

5- Determinação do grau de lipoperoxidação

Como muitas outras membranas biológicas, as membranas dos eritrócitos sofrem peroxidação lipídica devido a seu grande teor de lipídios poli-insaturados e porque estão diretamente expostas ao oxigênio, que serve como agente catalisador das complexas reações radicalares envolvidas nesse processo (CHIU et alii, 1982).

Na tentativa, de se tentar relacionar o efeito hemolítico dos detergentes Tween com uma possível ação oxidante, foram feitas análises da produção de malonildialdeído. Estes testes foram realizados porque alguns autores já haviam sugerido que esse tipo de mecanismo seria responsável pela ação hemolítica de surfatantes do tipo polioxietileno (AZAZ et alii, 1981; HAMADA et alii, 1982). Os testes com azida foram feitos para que, na ocorrência de resultados negativos, fosse possível garantir que este fato não fosse devido à degradação enzimática do peróxido de hidrogênio.

Como pode-se observar na tabela 7 para todos os testes efetuados na presença dos detergentes Tween, não foram observados resultados que indicassem a ocorrência de lipoperoxidação (tanto naqueles feitos sem azida de sódio, quanto naqueles feitos na presença de azida), como observou-se para os ensaios controle feitos com peróxido de hidrogênio 2 mM e 5 mM. A inclusão de azida de sódio em alguns

experimentos justifica-se por ser ela um agente inibidor da enzima catalase (NICHOLLS e SHONBAUM, 1963). Inibe-se a catalase por ela ser a enzima responsável pela degradação do peróxido de hidrogênio.

Determinação do grau de lipoperoxidação induzida pelos detergentes Tween

Ensaio	Absorbância		nmol MDA/ ml hemácia	
	com azida	sem azida	com azida	sem azida
controle-sangue	0,0054	0,0055	0	0
controle-Tween 20	0,0043	0,0042	0	0
controle-Tween 40	0,0046	0,0048	0	0
controle-Tween 60	0,0048	0,0050	0	0
controle-Tween 80	0,0044	0,0049	0	0
controle-H ₂ O ₂ -2mM	0,4216	-	2,7025	0
controle-H ₂ O ₂ -5mM	0,5092	-	3,2640	0
Tween 20	0,0050	0,0051	0	0
Tween 40	0,0054	0,0048	0	0
Tween 60	0,0051	0,0042	0	0
Tween 80	0,0049	0,0052	0	0

Tabela 7. Dosagem da produção de MDA em testes hemolíticos feitos com os detergentes Tween. A dosagem do MDA foi feita após o teste hemolítico, feito com os quatro homólogos na concentração final de 1% m/v (concentração de efeito hemolítico), em meio de NaCl 0,077, a 37°C.

6- Determinação eletroforética do padrão proteico dos "ghosts"

A figura 22 mostra o perfil eletroforético de proteínas de membrana em feito em sistema de gel de poliacrilamida-SDS. As cinco amostras analisadas correspondem a um controle ("ghost puro") e as outras quatro a "ghosts" que sofreram tratamento com os detergentes em suas correspondentes concentrações protetoras. Como pode-se observar em todas as amostras, não há diferença na mobilidade e no número das bandas proteicas. Nota-se também a ausência da banda de hemoglobina nas amostras controle e tratadas com o detergente, o que significa que a preparação de "ghosts" obtida foi de boa qualidade.

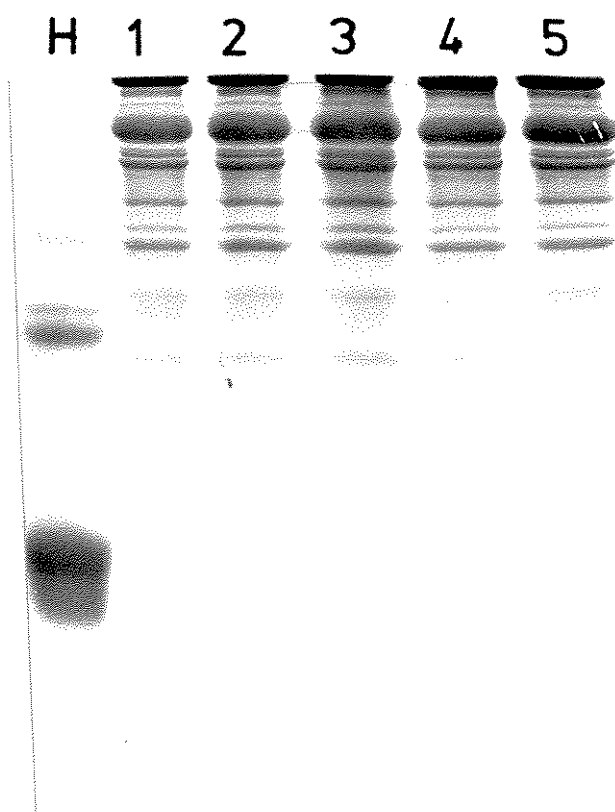


Figura 22. Perfil eletroforético em sistema de gel de poliacrilamida-SDS de proteínas de "ghosts" obtido pelo método de HANES E RICKWOOD (1981). (1) controle, (2) tratado com Tween 20 $8,2 \times 10^{-6}$ M; (3) tratado com Tween 40 $7,8 \times 10^{-7}$ M; (4) tratado com Tween 60 $7,7 \times 10^{-7}$ M; (5) Tratado com Tween 80 $7,6 \times 10^{-7}$ M ; (H) Hemoglobina.

7-Estudos de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

A partir desses registros obtivemos uma série de informações acerca das modificações estruturais da bicamada lipídica ocasionadas pelo tratamento com os detergentes Tween. A figura 23 mostra o padrão de espectro obtido do marcador (5-SASL) em membrana de hemácia (figura 23a), na micela do detergente Tween 80 (figura 23b), ambos obtidos em solução de NaCl 0,077 M a 37°C, e do marcador sozinho na mesma solução de NaCl (figura 23c). Como pode ser observado, na figura 23a temos o típico movimento rápido e isotrópico de um radical nítróximo, que gera um espectro de três linhas estreitas e de mesma intensidade. Em ambientes que levam o radical a ter movimentos mais lentos, observa-se um alargamento diferenciado das linhas espectrais como é observado nas figuras 23b e 23c. Na figura 23c, logo abaixo do traçado espectral, tem-se um detalhe do extremo externo ($A_{//}$), registrado com ganho maior, como usualmente se faz para facilitar a medida desse parâmetro em espectros deste tipo. Observa-se a diferença na primeira linha espectral nos registros feitos na micela do detergente (23b) e na membrana eritrocitária (23c).

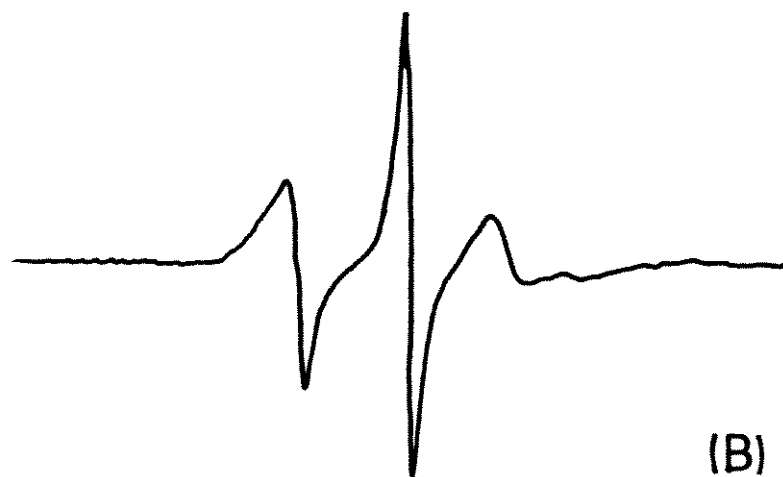
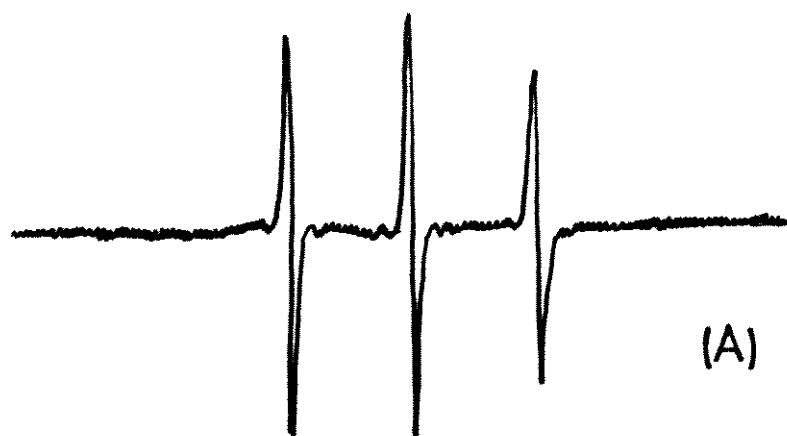


Figura 23. Espectros de RPE do marcador de spin 5-SASL ($5,0 \times 10^{-5} \text{ M}$) em (A) membrana de hemácia de rato; (B) micela de detergente; (C) solução de NaCl 0,077 M.

A figura 24 mostra os espectros obtidos em soluções de NaCl 0.077 M (37°C) de hemácias (Ht=50%) em concentrações crescentes do detergente Tween 80 (figura 24a- espectro das amostras totais; figura 24b- espectro dos precipitados e figura 24c- dos sobrenadantes, colhidos após centrifugação a 700 x g, por 10 minutos). Como pode ser observado na sequência de registros tomados da amostra total (figura 24a) inicialmente os espectros obtidos são tipicamente do marcador em membrana, até chegar a uma forma mais próxima da gerada pelo marcador em ambiente micelar. Da mesma forma, o mesmo comportamento, só que menos acentuado, pode ser observado na sequência de registros feitos nos precipitados das amostras (figura 24b). Tomando-se a sequência dos espectros dos sobrenadantes das amostras (figura 24c) observa-se inicialmente um fraco sinal do marcador em água (na solução). Contudo, a partir do quarto registro, já se observa um forte sinal, que assume um aspecto intermediário entre o padrão obtido nos ambientes membranosos e micelar.

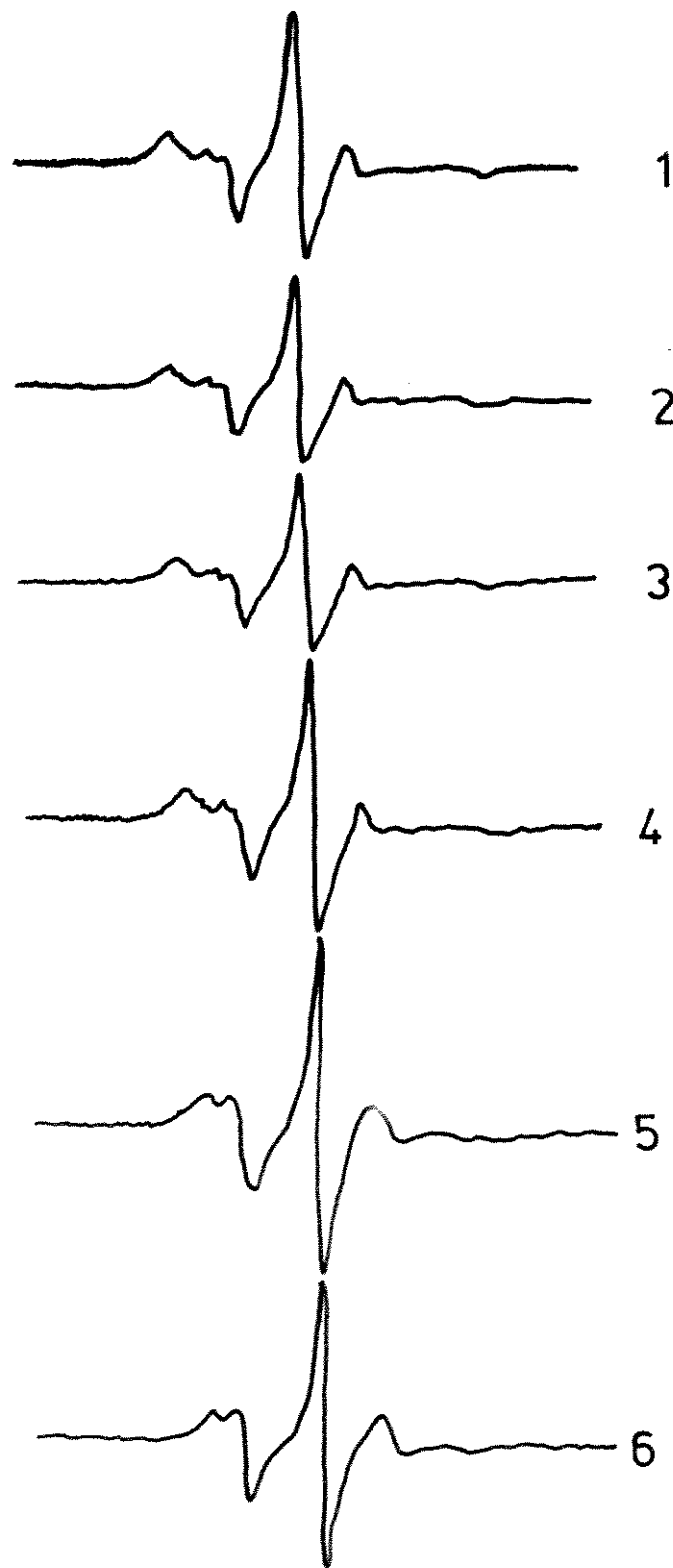


Figura 24a. Espectro de RPE do marcador 5-SASL ($5,0 \times 10^{-4} M$ em suspensão de hemácias em concentrações crescentes do Tween 80 (amostra total). (1) controle; (2) $7,6 \times 10^{-6} M$; (3) $7,6 \times 10^{-5} M$; (4) $7,6 \times 10^{-4} M$; (5) $7,6 \times 10^{-3} M$; (6) $7,6 \times 10^{-2} M$.

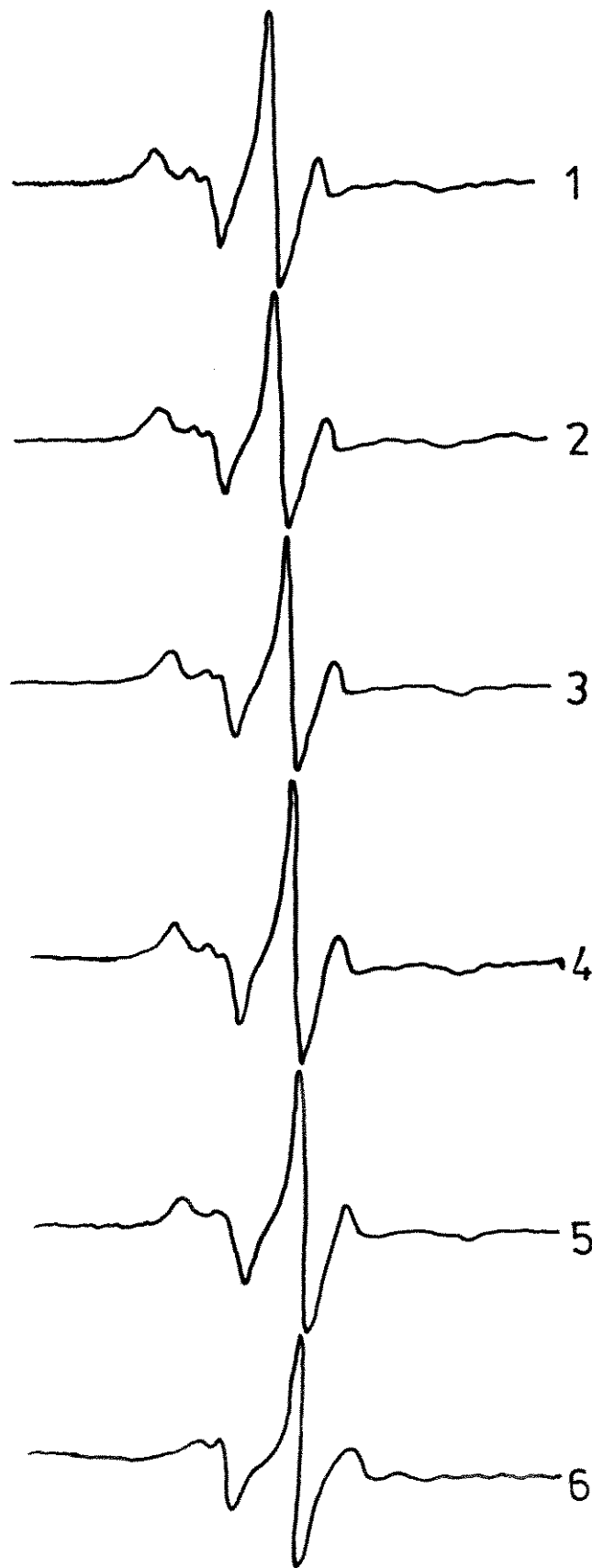


Figura 24b. Espectro de RPE do marcador 5-SASL ($5,0 \times 10^{-4} M$) em suspensão de hemácias em concentrações crescentes do Tween 80 (precipitado). (1) controle; (2) $7,6 \times 10^{-6} M$; (3) $7,6 \times 10^{-5} M$; (4) $7,6 \times 10^{-4} M$; (5) $7,6 \times 10^{-3} M$; (6) $7,6 \times 10^{-2} M$.

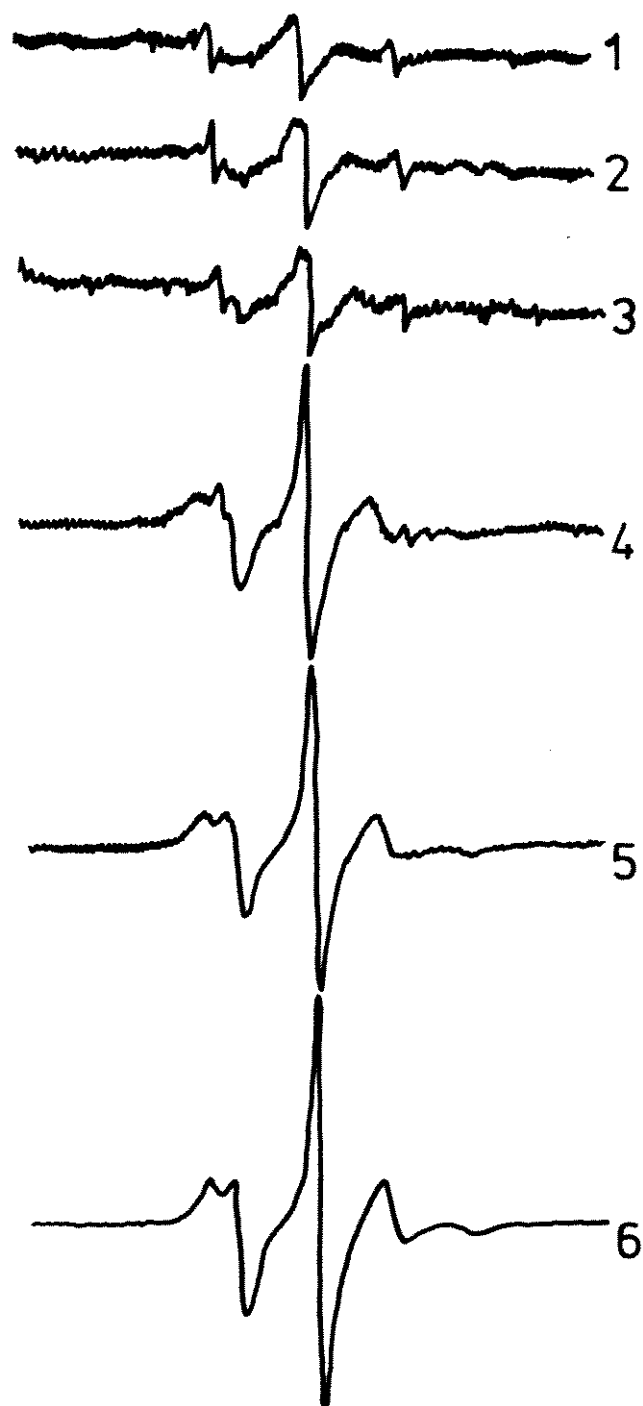


Figura 24c. Espectro de RPE do marcador 5-SASL ($5,0 \times 10^{-4} M$) em suspensão de hemácias em concentrações crescentes do Tween 80 (sobrenadante). (1) controle; (2) $7,6 \times 10^{-6} M$; (3) $7,6 \times 10^{-5} M$; (4) $7,6 \times 10^{-4} M$; (5) $7,6 \times 10^{-3} M$; (6) $7,6 \times 10^{-2} M$.

Nos espectros obtidos com marcador o 5-SASL, o cálculo de S pode ser feito a partir de $A_{//}$ e $A_{\perp}$. Os valores de S obtidos para os espectros de soluções totais, precipitados e sobrenadantes são apresentados na tabela 8. Observa-se uma queda no valor de S a medida que a concentração do Tween aumentou, tanto nos espectros obtidos da amostra total quanto nos obtidos dos precipitados. Nos espectros de sobrenadantes, a partir do momento que foi possível calcular esse parâmetro, seu valor sofreu apenas um pequeno aumento.

Tabela dos valores dos parâmetros de ordem obtidos para soluções totais, precipitados e sobrenadantes

Concentração de Tween 80 (CM)	Solução total			precipitado			sobrenadante		
	$A_{//}$	$A_{\perp}$	S	$A_{//}$	$A_{\perp}$	S	$A_{//}$	$A_{\perp}$	S
0	20,00	7,00	0,55	20,00	6,90	0,55	*	*	-
$7,6 \times 10^{-6}$	20,30	6,90	0,56	20,40	6,90	0,56	*	*	-
$7,6 \times 10^{-5}$	20,10	6,90	0,55	20,30	6,80	0,56	*	*	-
$7,6 \times 10^{-4}$	19,90	7,00	0,54	20,10	6,90	0,55	17,30	8,00	0,39
$7,6 \times 10^{-3}$	17,00	7,60	0,40	19,50	7,00	0,52	17,00	8,30	0,36
$7,6 \times 10^{-2}$	16,70	8,50	0,35	16,6	8,30	0,34	16,90	8,10	0,36

(*) - Nesses espectros tais parâmetros não puderam ser obtidos uma vez que não foram obtidos espectros em membrana.

Tabela 8. Foram feitos experimentos em 5 concentrações crescentes de Tween 80 e um controle. Dos espectros obtidos foram feitas medidas de $A_{//}$ e $A_{\perp}$, calculados os correspondentes valores de (S) a partir da equação (4).

Outro parâmetro que foi utilizado para a análise dos espectros foi a relação de alturas h_{+1}/h_0 simplificada, onde tomou-se apenas a altura do pico central. Conforme descrito anteriormente, quanto mais isotrópico for o meio, mais rápidos serão os movimentos do marcador, e portanto mais estreitos os picos obtidos. Dessa forma, uma variação na altura do pico central com o aumento da concentração do detergente será interpretado como uma mudança na organização do sistema.

A figura 25 mostra o gráfico dos valores de altura de h_0 contra os valores de concentração de Tween 80 nas soluções totais, precipitados e sobrenadantes, obtidos pelos espectros de RPE a 37°C. Nota-se o aumento do valor de h_0 com o aumento da concentração de Tween, tanto para os espectros das soluções totais, quanto para os espectros dos sobrenadantes. Nos espectros obtidos dos precipitados, nota-se comportamento mais constante dos valores de h_0 .

Variação da altura do pico central (h_0)
com o aumento da concentração do Tween

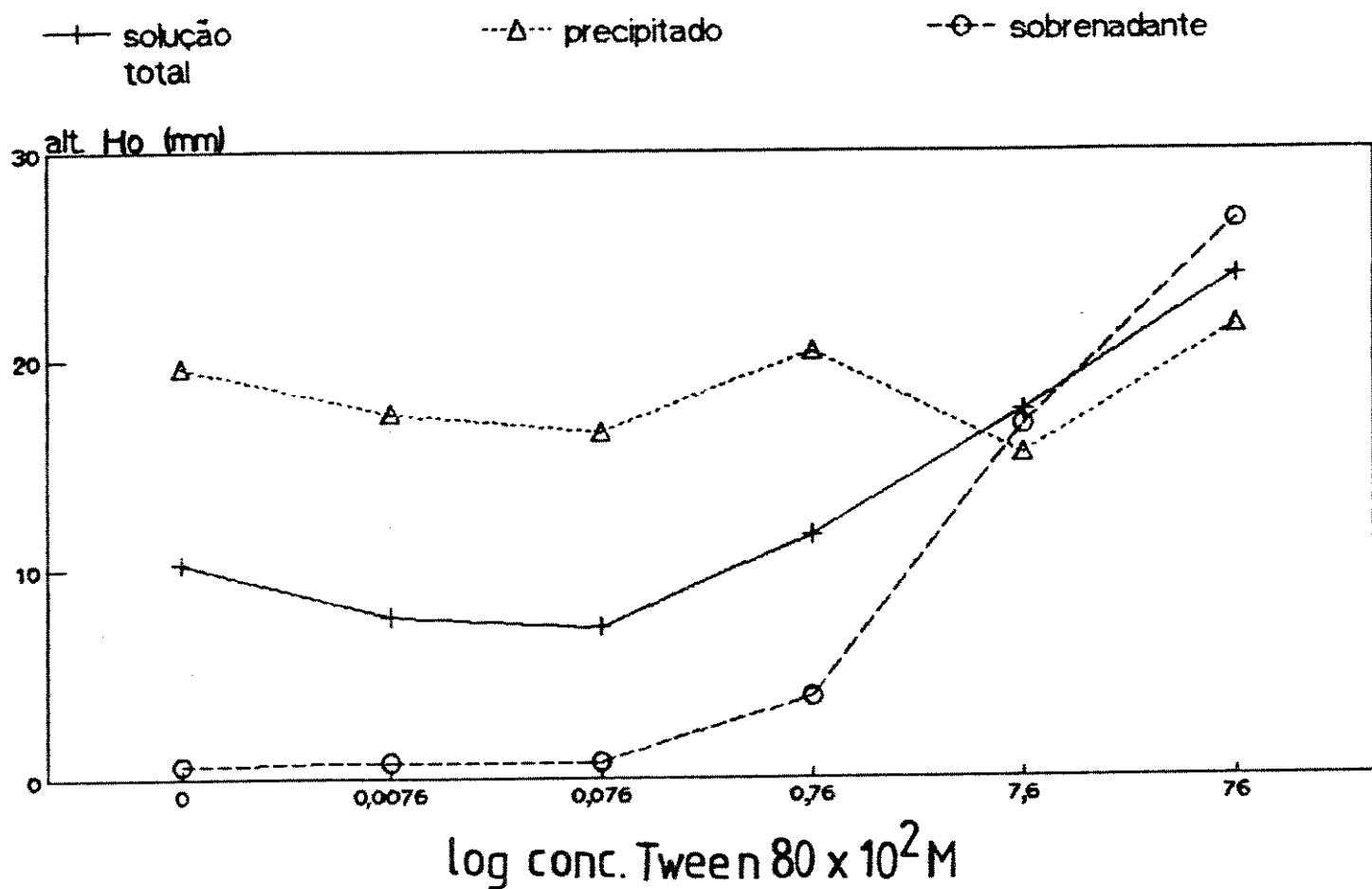


Figura 25. Variação da altura do pico central h_0 dos espectros do marcador 5-SASL ($5,0 \times 10^{-5}$ M) em soluções de hemácias de rato que continham diferentes concentrações do Tween 80: nas amostras totais, precipitados e sobrenadantes.

A determinação de fosfato efetuada nos sobrenadantes e precipitados das soluções analisadas por RPE tinha como objetivo acompanhar a remoção de porções da bicamada (membrana do eritrócito) e tentar relacionar esse evento com possíveis alterações nos espectros de RPE. Este fenômeno seria evidenciado por um gradual aumento da concentração de fosfato no sobrenatante, acompanhada por uma diminuição da concentração de fosfato no precipitado. Os resultados dessa determinação em precipitados e sobrenatantes, bem como o valor de absorbância dos sobrenatantes, nas condições de ensaio (Ht=50%), são apresentados no gráfico da figura 26. Pelo gráfico pode-se observar que a medida que a concentração do Tween 80 aumentou, a concentração de fosfato nos sobrenadantes aumentou e nos precipitados diminuiu. Quanto a curva hemolítica, esta mostrou o comportamento bifásico do Tween 80.

Relação entre a concentração de Pi e a
porcentagem de hemólise

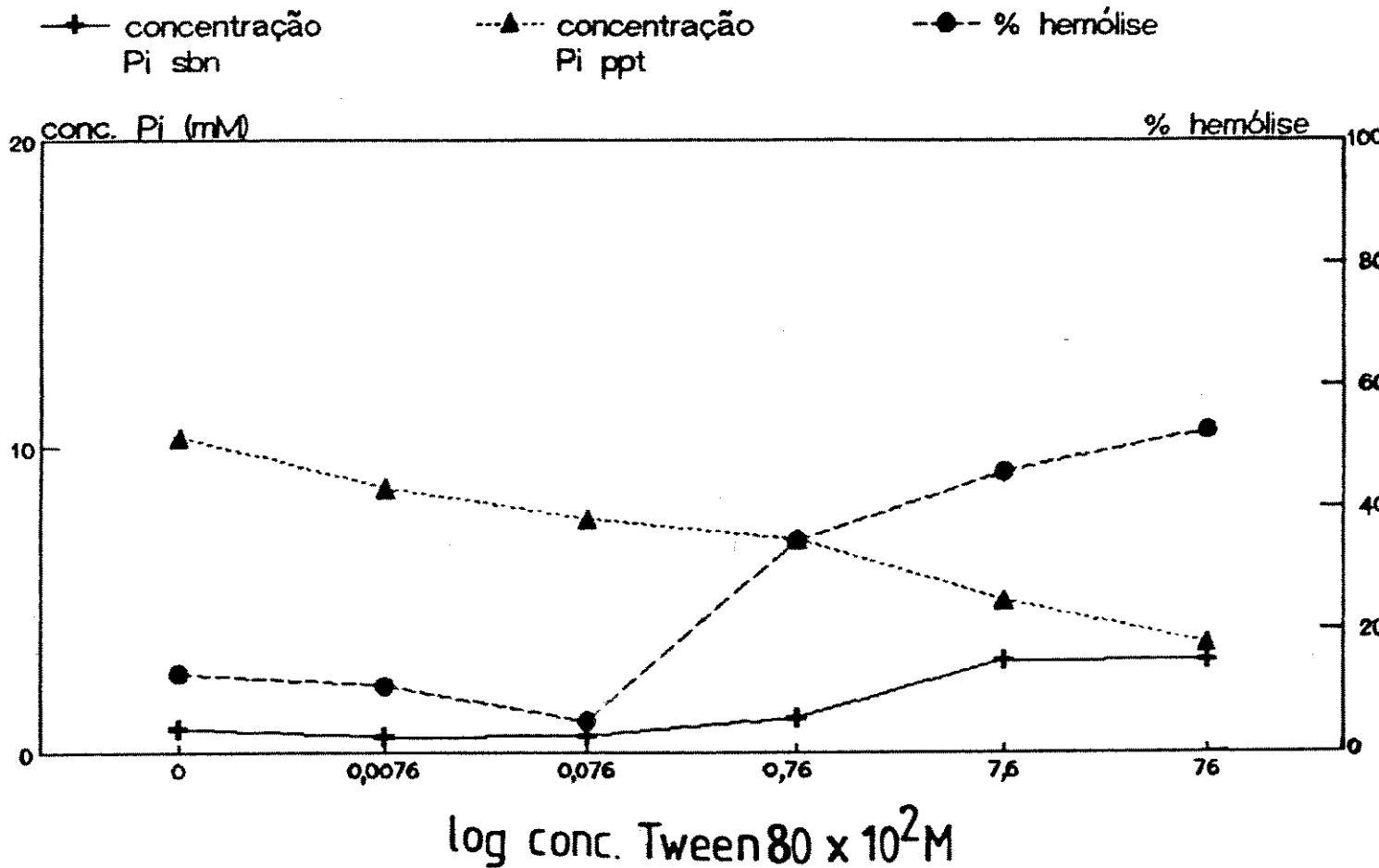


Figura 26. Concentração de fosfato nos precipitados e sobrenadantes de suspensão de hemácias tratadas com diferentes concentrações do Tween 80 e respectivos valores de taxa de hemólise. Estas dosagens foram feitas nas mesmas amostras que previamente haviam sido analisadas por RPE.

8- Difração de raios X a baixo ângulo

A técnica de difração de raios X nos fornece a resolução de estruturas biológicas, através da determinação da posição das moléculas que as compõem. Desta forma, por fornecer informações a níveis tão precisos das estruturas submetidas a estudo, a técnica de difração de raios X a baixo ângulo foi empregada com o objetivo de relacionar o efeito protetor dos detergentes estudados com uma das duas hipóteses :

1- Que tal efeito estaria relacionado com remoções de porções da membrana (fossem essas porções componentes lipídicos ou proteicos), de tal forma que levassem à estabilização da membrana do eritrócito compensando a situação de stress osmótico e de pH. Neste caso, poderia-se dizer que, mesmo sendo o efeito final da ação dos detergentes Tween de proteção para a célula, tal efeito era obtido através de uma ação que lesaria a membrana.

2- Ou que, ao invés de porções da membrana estarem sendo removidas, o que estaria ocorrendo seria a incorporação de moléculas de detergente na membrana, de forma a estabilizá-la, e promover a sua proteção contra as condições de stress.

A partir da exposição das amostras aos raios-X, o que se obtém primeiramente, são diagramas das difrações originadas pelas estruturas periódicas da membrana, que possuem espaçamentos característicos. Alterações nestes espaçamentos refletem a ocorrência de mudanças estruturais, que no caso, estariam sendo ocasionadas pela

interação com o detergente.

Os diagramas de raios-X obtidos para ghosts puros e tratados com Tween 60 são apresentados nas figuras 27a e 27b. Nota-se um aumento de intensidade na terceira linha de difração no diagrama da amostra tratada com o detergente.

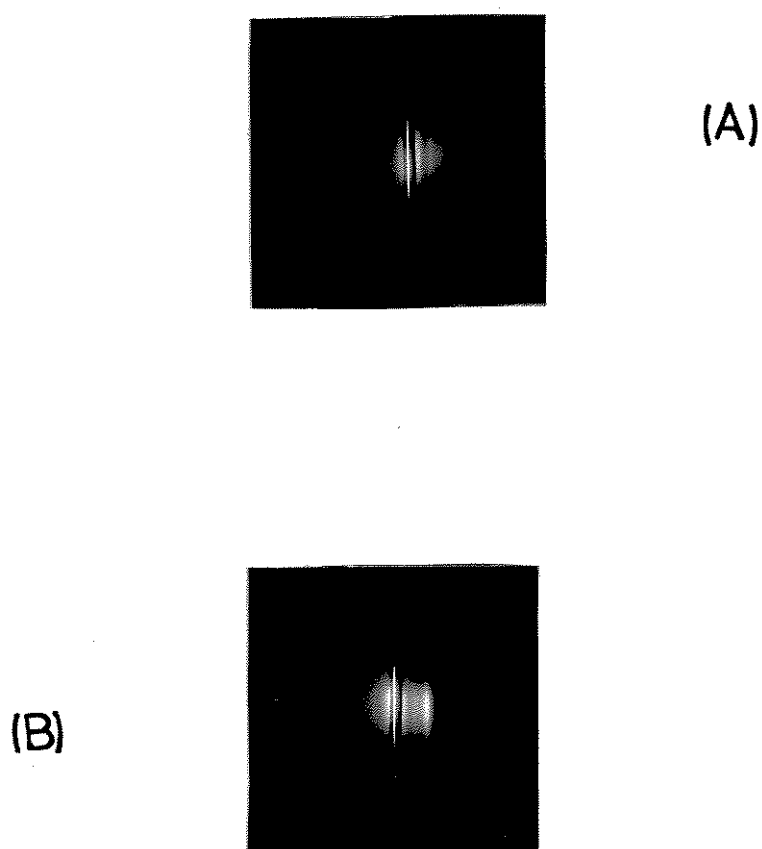


Figura 27. Diagramas de difração de raios-X obtidos de "ghosts" de hemácias de rato (A) puros, e (B) tratados com o Tween 60 $7,7 \times 10^{-7}M$.

A partir dos diagramas obtidos, foram feitos traçados microdensitométricos (figuras 28a para "ghosts" puros e 28b para "ghosts" tratados com detergente Tween 60), que forneceram as posições das reflexões, para o cálculo dos espaçamentos característicos. O cálculo desses espaçamentos é feito aplicando-se a lei de Bragg :

$$(5) \quad 2d \sin \theta = n \lambda$$

onde n é um número inteiro e define a ordem da reflexão, θ é o ângulo formado pelos feixes incidente e difratado com o plano difratante (ângulo de Bragg), d é o espaçamento interplanar (por exemplo a espessura da bicamada fosfolipídica) e λ é o comprimento de onda dos raios-X.

Nos traçados microdensitométricos também pode-se observar o acentuado aumento de intensidade na terceira linha de difração da amostra tratada com o Tween 60.

Como já mencionado, nos diagramas obtidos são observadas três reflexões que, a partir dos traçados microdensitométricos e da aplicação da lei de Bragg, determinou-se serem correspondentes a espaçamentos de 150 Å.

Um reforço notável na intensidade da terceira reflexão é observado no diagrama das membranas tratadas com o detergente.

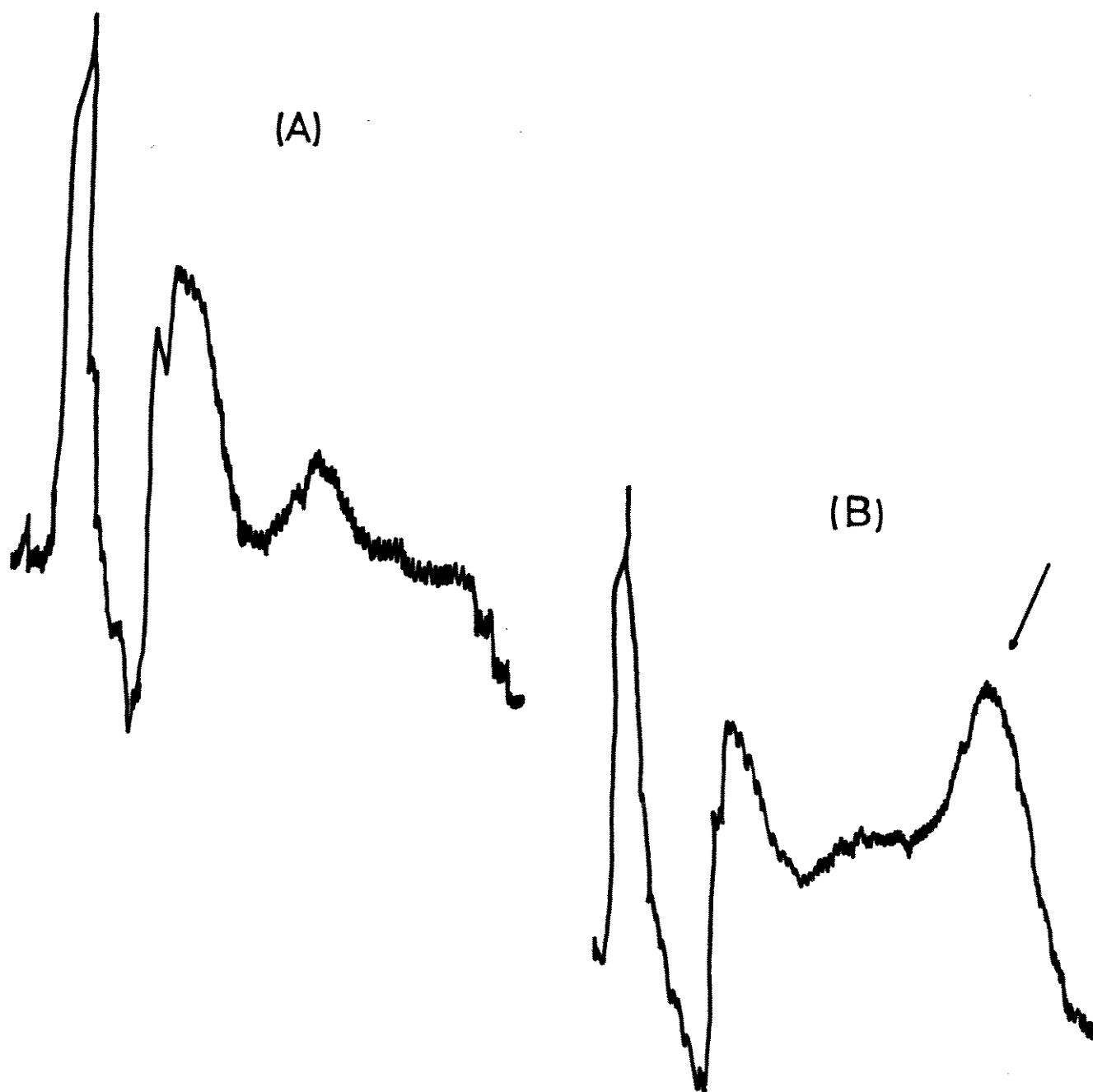


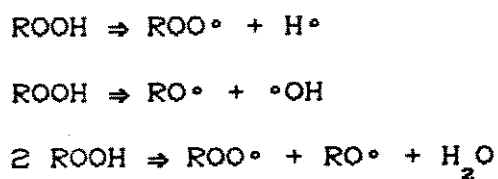
Figura 28. Traçados microdensitométricos obtidos de diagramas de difração de raios-X de "ghosts" de hemácias de ratos (A) puros, (B) tratados com Tween 60 $7,7 \times 10^{-7}$ M..

DISCUSSÃO

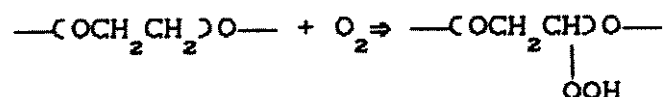
A peroxidação dos polisorbatos pode ocorrer através de reações em cadeia similarmente às que ocorrem com óleos e ésteres, se processando de acordo com o seguinte esquema (DONBROW et alli, 1978) :



ou ainda



No caso de surfatantes polioxi-etileno a peroxidação ocorre na cadeia hidrofílica e as etapas resultam em hidroperóxidos de unidades oxietileno :



A concentração de hidroperóxido medida por iodometria fornece um índice do processo de autooxidação que poderia ocorrer em condições específicas (luz, pH e temperatura) de acordo com DONBROW et alii (1978).

No presente trabalho a determinação do processo de autooxidação dos deterregntes polioxi-etileno estudados forneceu dados consistentes com a ausência da formação de peróxidos nas condições de ensaio.

Este resultado está de acordo com dados anteriores de literatura onde a formação de hidroperóxido, nas condições utilizadas (pH, temperatura e luz) é próxima de zero até o décimo dia de preparação da solução do surfatante (DONBROW et alii, 1978).

Todavia, como detergentes de diferentes procedências podem apresentar níveis de peroxidação variáveis (como é mostrado na tabela 9

para o Tween 20), o teste de peroxidação fez-se necessário para assegurar a qualidade dos detergentes usados posteriormente em ensaios biológicos.

Níveis de peroxidação em detergentes Tween 20 (DONBROW et alii, 1978).

surfatante	amostra (a)	n° peróxidos mEq/kg
Tween 20	A	14,6
	B	4,5
	C	0,13
	D	0,07
	E	0,05

(a) A, B, C- ICI Atlas, Wilmington, Del.

D- Sigma, St. Louis, Mo.

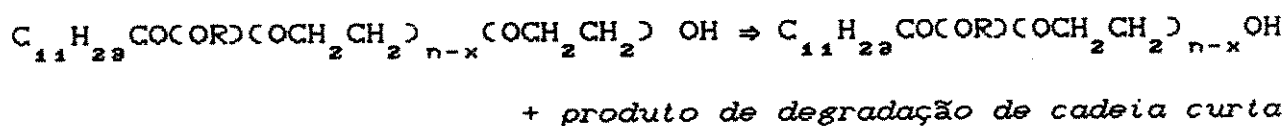
E- NBC, Cleveland, Ohio.

Tabela 9. Diferentes concentrações de peróxidos encontrados em detergentes Tween 20 de diferentes procedências.

Outro critério usado para avaliar a qualidade dos detergentes utilizados foi o da determinação experimental da CMC. O valor encontrado de $0,9 \times 10^{-5}$ M para o Tween 80 determinado em condições de ensaio (37° C, 0,077 M NaCl) é bastante próximo do valor obtido para condições padrão $1,0 \times 10^{-5}$ M (HELENIUS et alii, 1979). Este resultado

além de confirmar a mínima influência da temperatura e concentração de sal utilizadas (como HELENIUS e colaboradores, 1979, já haviam reportado para situações similares), evidencia a ausência do processo de peroxidação dos grupamentos oxietileno também.

É interessante que seja feita a confirmação dos resultados negativos dos testes iodométricos para o caso de que tais resultados apenas tenham sido obtidos devida a rápida degradação do peróxido e não devido à sua completa inexistência. A velocidade de formação de peróxido durante o estágio inicial de propagação é normalmente mais rápida que a velocidade de decomposição. Esta velocidade subsequentemente fica igual, seguido-se de um estágio onde a velocidade de decomposição é mais rápida. Caso o teste de reatividade com KI tenha sido feito justamente na etapa onde a velocidade de degradação era maior que a taxa de formação, o resultado negativo obtido seria falso. A CMC vem confirmar a ausência da formação de peróxido dado ao fato de que este processo ocasiona uma conseqüente degradação das cadeias polioxietileno, dando origem a fragmentos de peso molecular menor, como é representado no esquema a seguir para o Tween 20:



onde R é o anel sorbitol, n o número de grupamentos oxietileno originalmente presentes e x é o número de oxietileno peroxidados e subsequentemente decompostos.

A presença de tais fragmentos menores pode ser detectada através da análise de algumas propriedades do detergente, sendo uma delas a CMC. A CMC de um dado anfifílico é característica para sua composição, e caso este sofra degradação de suas cadeias, conseqüentemente tem-se alteração do valor desta propriedade.

O conhecimento do valor da CMC também teve relevância para a escolha das concentrações dos detergentes a serem usadas no modelo biológico empregado, visto que vários efeitos biológicos podem ser suprimidos ou modificados, quando o detergente se encontra abaixo ou acima da sua CMC. Este é o caso por exemplo de estudos feitos sobre o transporte de hidrocortisona por surfatantes, nos quais nem o Tween 80, nem o Solulan 25, nem o Solulan 16 aumentaram a velocidade de dissolução do referido esteróide, até que suas respectivas CMC fossem atingidas (HAJRATWALA e TAYLOR, 1976). Nas mesmas concentrações, o Tween 80 aumentou a taxa de absorção do secobarbital, apenas quando se encontrava abaixo da sua CMC, ocasionando diminuição dessa taxa quando em concentrações acima da sua CMC (LEVY e ANELLO, 1968). Inúmeros estudos têm sido feitos sobre a influência dos surfatantes na absorção de drogas, mostrando a capacidade desses agentes em exercer um efeito na transferência dessas drogas através de membranas biológicas. Talvez o relato mais antigo sobre este fato tenha sido o trabalho de BILLARD e DIEULAFÉ (1904) onde o efeito tóxico do curare injetado intraperitonalmente em cobais aumentava quando se adicionava sabão à solução injetada. Observações recentes comprovam a ação do Tween 80 em aumentar a velocidade de transporte de metotrexato no cérebro (AZMIN et

alii, 1982). O aumento da permeabilidade das membranas a drogas, em presença de compostos tensoativos, pode implicar em alterações destas membranas.

As alterações morfológicas detectadas em presença dos Tween demonstram que estes surfatantes apresentam comportamento de proteção ao inchamento ("swelling") das hemácias produzido pelo "stress" hipoosmótico (figuras 19a, 19b, 19c e 19d), evidenciado pelo aparecimento de células crenadas ou "cup form" em tal condição. Segundo estudos realizados por SHEETZ e SINGER (1974) e por FUJII (1979), tipicamente drogas com grupo polar aniônico induziriam a crenação da membrana enquanto que drogas com grupo polar catiônico induziriam invaginações ("cup form"). De acordo com estes trabalhos também, moléculas muito solúveis em água (que portanto contém muitas regiões polares) não exerceriam tais efeitos nas células, uma vez que provavelmente elas não podem ser incorporadas na membrana. Assim sendo, as modificações que os detergentes Tween ocasionam, comprovam que tais moléculas incorporam-se na membrana. FUJII (1979) trabalhando com álcoois de cadeia alifática longa relatou uma transição entre hemácias crenadas e "cup form" após o tratamento com os compostos testados. Seus experimentos revelaram que estes compostos atravessariam a bicamada, de forma que, em situação de viscosidade reduzida da membrana, apenas hemácias crenadas eram detectadas. Desta forma FUJII (1979) relacionou a crenação da membrana com uma interação dos compostos testados restrita à porção externa da bicamada lipídica. Em condições de viscosidade normal, onde pode ocorrer o livre trânsito das moléculas em questão, estas podem

atingir a porção interna da bicamada. Nesta situação, não havendo mais moléculas remanescentes na porção externa da membrana, o que se observou foi o aparecimento das hemácias "cup form". Se agora analisarmos o caso dos detergentes Tween, podemos então dizer que em meio não tamponado, de alguma forma há um efeito que, similarmente às condições de menor viscosidade utilizadas por FUJII (1979), restringiria a penetração desses anfifílicos à porção externa da bicamada, ao passo que, em meio tamponado (condição mais próxima da fisiológica) a penetração dos detergentes é maior, podendo estes atingir a camada interna da membrana. As fotos obtidas (figuras 19a, 19b, 19c e 19d) se observadas revelam que nem todas as células do campo possuem a mesma forma, o que indica um processo dinâmico de penetração do detergente.

O experimento clássico de hemólise foi efetuado após a detecção das alterações morfológicas dos eritrócitos, com a finalidade de estabelecer o grau de integridade da membrana exposta a condições estressantes em presença dos detergentes Tween.

O fenômeno lítico ocasionado por detergentes tem sido bastante explorado, porém, o mecanismo deste processo ainda não foi completamente elucidado. Detergentes não iônicos promovem perturbações em membranas, e tais efeitos tem sido correlacionados com o valor do HLB desses compostos (HELENIUS e SIMONS, 1975). Aceita-se que o HLB está mais relacionado com a capacidade do surfatante de se ligar à membrana do que com sua atividade lítica (ZASLAVSKY et alii, 1978).

Inicialmente estudamos o efeito dos detergentes Tween, sobre a fragilidade osmótica, quando o processo hemolítico é estimulado em função da baixa concentração de sal. De acordo com as figuras 21a, 21b, 21c e 21d, observa-se um efeito bifásico para todos os homólogos. O efeito de diminuição da fragilidade osmótica em concentrações na faixa de 0,0001 - 0,01% m/v foi verificado para os detergentes da série Triton (TRAGNER e CSORDAS, 1987). O que se deve levar em conta, quando se compara o efeito protetor do Triton em relação ao Tween, é o fato de que para ambos, as concentrações relacionadas a este efeito estão abaixo dos valores de suas CMC's (exceto para o caso do Triton x-45). RYBCZYNSKA e CSORDAS (1989) também observaram que o efeito bifásico observado para ácidos graxos livres não eram correlacionado com a CMC desses compostos. Outro aspecto importante quando se compara o comportamento dos detergentes Tween com o dos Triton, é que para os Tween a concentração protetora não se estende por uma faixa tão ampla quanto demonstrou ser para os detergentes da série Triton.

O processo de fragilização osmótica é resultado da entrada de água ocorrida principalmente durante o processo de "swelling" (ARAKI e RIFKING, 1981). A fragilidade é então, principalmente determinada pela relação entre o volume inicial e o volume crítico (V_i/V_c) da célula. A relação entre fragilidade e a razão V_i/V_c foi previamente demonstrado para anestésicos e tranquilizantes, como a clorpromazina e o etanol. Assim o decréscimo na fragilidade osmótica a baixas concentrações destes compostos tem sido correlacionada com o aumento da área da membrana, isto é, ao aumento do volume crítico sem alteração do volume inicial da

célula em soluções isotônicas (ROTH e SEEMAN, 1972).

Comparando-se os homólogos da série Tween testados, podemos notar que a concentração protetora 0,0001 % m/v foi comum para os Tween 40, 60 e 80, enquanto que para o Tween 20 esta concentração foi dez vezes maior. Ficou demonstrado também (como mostra a tabela 6), que em termos de efetividade de proteção todos os homólogos tiveram um comportamento muito próximo. Analisando estes resultados, poderíamos sugerir que este efeito protetor não está relacionado ao número de polioxietileno, visto que todos os detergentes possuem o mesmo número (20). Em relação ao número de carbonos das cadeias de ácidos graxos, que é o fator de diferenciação dos quatro homólogos (Tween 20 = C_{12} , Tween 40 = C_{16} , Tween 60 = C_{18} e Tween 80 = $C_{18:1}$) como pode ser observado pelos dados fornecidos pela tabela 2, tais variações não implicaram em diferenças acentuadas em suas propriedades físico-químicas. Segundo RYBCZYNSKA e CSORDAS (1989) para que um efeito bifásico dependente de concentração ocorra na interação de ácidos graxos com a membrana eritrocitária, o fator limitante seria o da existência de uma cadeia de no mínimo doze carbonos, e quanto a este aspecto, os resultados por nós obtidos estão coerentes, uma vez que o homólogo de menor cadeia apresenta 20 carbonos. Segundo estes autores o aumento do número de carbonos em cadeias acima de 12 carbonos é relacionado com o aparecimento de uma segunda faixa de concentração onde também se observa o comportamento bifásico. No caso dos detergentes Tween por nós testados este fato não foi observado, uma vez que essa segunda faixa de concentração foi por eles determinada apenas quando foram utilizadas

concentrações muito acima daquelas por nós testadas.

Para os detergentes não iônicos da série alkyl-sulfatos a propriedade lítica por eles expressa está correlacionada com o comprimento da cadeia e com o número de grupos polioxietilenos (ZASLAVSKY et alii, 1978). O poder lítico diferenciado para tal classe de compostos, poderia estar relacionado com o tamanho de suas porções hidrofílicas e lipofílicas e parece que o volume do grupo lipofílico pode compensar um reduzido tamanho de cadeia carbônica. O papel da porção hidrofílica na atividade lítica do composto pode ser devido ao seu efeito no momento dipolar total do agente ou em sua lipofilicidade relativa ou ainda devido à interação desse fragmento com componentes da membrana quando tal agente se liga à mesma. Fato é que esta questão permanece não totalmente esclarecida, e os resultados por nós obtidos enfatizam a necessidade de um maior número de estudos para a compreensão do mecanismo da ação lítica dos detergentes não iônicos.

Nossos resultados, bem como aqueles obtidos por RYBCZYNSKA e CSORDAS (1989) mostram que tamanhos de cadeias lipofílicas diferentes são efetivos na promoção dos dois fenômenos, de lise e de proteção.

O processo lítico para alguns surfatantes polioxietileno (Texofor A e Cetomacrogol) foi investigado em comparação com as propriedades hemolíticas de saponinas e do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Destes estudos conclui-se que, devida à similaridade dos efeitos

obtidos para esta classe de surfatantes com os obtidos para o peróxido de hidrogênio, a formação de peróxidos e de radicais livres eram a principal responsável por tal processo (AZAZ et alii, 1981). Em experimentos de auto oxidação induzida por peróxido de hidrogênio, STOCKS e DORMANDY (1971) demonstraram que a peroxidação lipídica medida em função de uma resposta positiva em um teste com o ácido tiobarbitúrico (TBA), pode resultar em uma significativa lesão para eritrócitos em termos hemolíticos. Nos experimentos descritos por STOCKS e DORMANDY (1971), a peroxidação lipídica ocorre antes da hemólise. Além disso uma hemólise significativa ocorre apenas quando a produção de MDA atinge um nível crítico. Estes resultados sugeriram que a peroxidação lipídica causa tanto mudanças na estrutura quanto na função da membrana, de forma que, as alterações produzidas contribuem para o evento hemolítico. Neste sentido, embora tenhamos comprovado a ausência do processo de autooxidação nos estoques dos detergentes Tween testados, julgamos ser necessário averiguar se havia lipoperoxidação, para confirmar se os testes iodométricos e determinação da CMC teriam sido suficientes para afastar a hipótese da participação de radicais peróxido no efeito hemolítico, visto que, tal fenômeno era induzido na presença de concentrações crescentes dos detergentes. Com este objetivo fez-se os experimentos de determinação da produção de malonildialdeído (MDA) na presença e ausência de azida de sódio, agente inibidor da enzima catalase. Em ambas as condições, como pode-se observar na tabela 7, não detectamos a formação do MDA, excluindo-se portanto a possibilidade de que o mecanismo de ação hemolítica dos Tween fosse semelhante ao relatado para o Texofor e Cetomacrogol.

Os resultados obtidos para as alterações morfológicas eritrocitárias e comportamento hemolítico demonstrados pelos detergentes Tween, provaram a existência de uma desestruturação da membrana biológica. Tal fato nos levou a indagar sobre a possibilidade de interação dos detergentes com as proteínas da membrana do eritrócito, à semelhança do que ocorre para a membrana plasmática renal que sofre rupturas na presença de detergentes não iônicos (FOSTER et alii, 1976). Neste processo a ruptura se processa pela ligação do detergente na sua forma monomérica com os grupos polares expostos de proteínas, seguindo-se a formação de micelas mistas do detergente com fragmentos da membrana.

Outro exemplo interessante que relaciona a interação com proteínas da membrana com a lise, é o da melitina, que forma agregados com a banda 3 da membrana eritrocitária, induzindo a formação de partículas intramembranas (HUI et alii, 1990).

O perfil eletroforético por nós obtido (figura 22) quando os "ghosts" foram previamente tratados com os Tween, foi semelhante ao obtido para o "ghost" controle, demonstrando que não estavam ocorrendo interações com proteínas, que pudessem ser detectadas com essa técnica.

Uma vez que não se conseguiu relacionar o comportamento lítico dos detergentes Tween com uma possível ação peroxidante, e nem tão pouco correlacionar o efeito protetor com a interação desses compostos com as proteínas da membrana, buscou-se então relacionar, o

comportamento dos detergentes Tween frente à membrana eritrocitária, com uma possível interação desses compostos com porção lipídica da membrana, de forma a alterar sua estrutura. Na busca de tal resposta, foram realizados os experimentos de RPE e difração de raios X, técnicas essas consagradas pelo tipo de informação estrutural que podem fornecer sobre o objeto de estudo.

Observando os espectros de RPE obtidos para as suspensões de hemácias, precipitados e sobrenadantes das soluções preparadas com concentrações crescentes do Tween 80, podemos notar que quando a relação molar detergente:lipídio era pequena nenhum efeito maior na estrutura da membrana da membrana foi observado e essencialmente nenhum espectro de RPE foi detectado nos sobrenadantes. Na medida em que a razão detergente:lipídio cresceu, antes que fosse feita uma centrifugação, as amostras forneceram espectros compostos (figura 24a). Isto pode ser observado se compararmos a figura 24a, aos padrões de espectros obtidos em diferentes ambientes (membrana, micela e água) como mostra a figura 23. Espectros do marcador em membrana (ambiente mais anisotrópico) são caracteristicamente mais imóveis, o que faz com que haja nítida diferenciação entre as três orientações possíveis do radical, como pode ser acompanhada pela desigualdade das formas das três linhas espectrais em tal registro (notar o achatamento da terceira linha). Espectros móveis, como é o caso do marcador em meio aquoso (NaCl 0,077 M) geram linhas mais rápidas e estreitas, o que significa que devido à rápida movimentação do radical (mobilidade essa possibilitada pela isotropia do meio), não é possível fazer a distinção entre as orientações

preferenciais do marcador de spin (notar como as três linhas são finas e parecidas). O caso da micela é uma situação intermediária e se observado detalhadamente o seu espectro, podemos perceber que ele possui uma forma característica (notar a ponta que aparece na primeira linha), intermediária entre as duas situações há pouco descritas. Quanto aos espectros dos precipitados (figura 24b) estes tipicamente mostraram ser correspondentes a espectros do ambiente da membrana, e quanto aos espectros dos sobrenadantes (figura 24c) nestes podem ser observadas crescentes intensidades de espectros compostos.

Quanto ao parâmetro de ordem (S) calculado à partir das medidas de $A_{//}$ e $A_{\perp}$, podemos claramente ver (tabela 8) que ele diminuiu bastante (para amostras totais e de precipitados) à medida que a concentração do detergente aumentou. Nos espectros dos sobrenadantes, a partir do momento em que foi possível detectá-los, o parâmetro de ordem determinado permaneceu praticamente igual, assumindo sempre um valor pequeno, equivalente ao extremo inferior dos valores encontrados para os espectros de precipitados e amostras totais. A partir destes dados podemos dizer que a medida em que a concentração do detergente aumentou, a ordem do sistema da membrana diminuiu, e o novo sistema que aparece no sobrenadante já surge como um sistema menos ordenado do que o de uma membrana.

Tomando-se os valores de h_0 (pico central), mostrados na figura 25, podemos ver que essa medida tomada dos espectros das amostras totais, teve um aumento de valor com o aumento da concentração do detergente. Um aumento na altura do pico central reflete uma maior

mobilidade do marcador, consequência do aumento da desordem do meio. O aumento da isotropia do meio por sua vez, nada mais é do que a expressão da liberdade do ambiente, da desorganização do meio em que o marcador está. Podemos observar pela figura 25 que o aumento de h_0 nas amostras totais é principalmente devido ao aumento do valor desse parâmetro nos espectros dos sobrenadantes. Também nos espectros dos precipitados o valor de h_0 aumentou, porém relativamente menos que nos espectros dos sobrenadantes e das amostras totais.

Se somadas as informações fornecidas pela diminuição do valor do parâmetro de ordem (S) e pelo aumento da altura do pico h_0 , podemos sugerir que de uma forma geral nas três amostras investigadas (amostras totais, precipitados e sobrenadantes), em especial nas amostras de sobrenadantes, há uma crescente desordem e, possivelmente, mobilidade das estruturas que as compõem. Desta forma, ao que parece, taxas crescentes da razão detergente:lipídio gerariam quantidades crescentes de agregados polidispersos mistos (detergente-membrana). Comparando-se tais resultados com os efeitos ocasionados pelo Triton X-100 (ARAKI e RIFKING, 1981) verificamos que o Tween parece exercer um efeito mais nocivo que o Triton, o que pode ser avaliado tanto pelos valores menores do parâmetro de ordem, quanto pela concentração dez vezes menor de Tween requerida para provocar o mesmo efeito desestabilizador que do Triton. O fenômeno comum aos dois detergentes é a correlação da modificação da fluidez da bicamada lipídica da membrana que ocasionaria a posterior ruptura da mesma, desencadeando assim, o processo lítico.

Evidência adicional da presença de fosfolipídios em pelo menos alguns desses agregados foi dada pela determinação da concentração de fosfato (PO_4) em precipitados e sobrenadantes. Como é possível ver pela figura 26, a medida que a quantidade de PO_4 cresce nos sobrenadantes, ela decresce nos precipitados.

Se agora relacionarmos o mecanismo do processo de formação de micelas mistas com os efeitos hemolíticos ocasionados pelo tratamento das membranas com concentrações crescentes dos detergentes Tween (ver figura 26), podemos observar que na concentração onde é observado o efeito protetor, não há detecção dos espectros mistos no sobrenadantes (só são detectados fracos espectros do marcador em água). Isto mostra que todo o detergente adicionado à solução, até esse momento, é incorporado à membrana, mesmo teoricamente o detergente estando já acima da sua CMC. Nesta concentração S e h_0 não sofreram alteração de seus valores, o que demonstra que o efeito protetor não é associado com desordem da membrana. A partir desta concentração já passam a ser detectados espectros de sobrenadante e concomitantemente a sua detecção, temos o aumento da taxa de hemólise, ou seja, a expressão do efeito lítico do detergente.

Para confirmar que o detergente na concentração que ocasionaria o efeito protetor não promovia alteração na ordem da bicamada lipídica e simplesmente estaria se intercalando na mesma (na sua forma monomérica), efetuaram-se os estudos da estrutura da bicamada eritrocitária, através da técnica de difração de raios X.

Pelos diagramas de raios X obtidos foram detectadas três linhas de difração correspondentes a espaçamentos de 150 Å, compatíveis com uma estrutura lamelar de membranas assimétricas (PAPE et alii, 1977) e que parecem corresponder ao espaçamento L_1 mostrado na figura x. REISS-HUSSON e LUZZATI (1964) haviam descrito também valores de espaçamento muito próximos desse valor (por volta de 170 Å). Fato é que, fatores como, teor de hemoglobina retida e quantidade de solução tampão na amostra afetam o espaçamento, podendo portanto serem os responsáveis pela divergência dos resultados obtidos por diferentes autores. De qualquer forma, o tratamento com os detergentes e o método usado para desidratar as amostras, não parecem ter afetado a ordem no empilhamento nem ter produzido separação de fase dos componentes das membranas como é comum de ocorrer em membranas desprovidas de hemoglobina (PAPE et alii, 1977). Se bem observadas as difrações obtidas, podemos notar uma certa difusão das linhas. De fato, isso não é de se estranhar uma vez que se trata de difrações produzidas por membranas naturais. Nessas membranas a difusão é dada pela presença de proteínas, que como não estão em estado cristalino não difratam, mas desordenam o arranjo lamelar.

O aumento de intensidade da terceira linha de difração dos diagramas de difração de raios X (figuras 27 e 28) foi um dado muito valioso para que se propusesse o mecanismo da interação dos detergentes Tween com a membrana eritrocitária. A partir desse resultado podemos dizer que os detergentes Tween quando na concentração protetora, interagem com a membrana eritrocitária de forma a não alterar os espaçamentos da estrutura lamelar. O que esse aumento de intensidade

reflete, é que existem mais átomos difratando na posição dessa terceira linha após a exposição das membranas ao detergente. Desta forma pode-se sugerir que essas moléculas "a mais" na estrutura lamelar seriam monômeros do detergente que se incorporaram na membrana. Além do mais, os dados fornecidos pelo estudo de RPE dão suporte a essa interpretação, uma vez que quando se empregou a mesma concentração de detergente determinou-se que todo o detergente presente estaria realmente na membrana, uma vez que não foram detectados espectros nos sobrenadantes dos ensaios, como já foi descrito anteriormente.

CONCLUSÕES

Neste trabalho nos propusemos a estudar a interação de detergentes derivados do polioxietileno-sorbitol com eritrócitos. Os resultados obtidos nos permitiram chegar às seguintes conclusões:

1. Os detergentes da série Tween apresentam comportamento bifásico em relação ao fenômeno lítico, dependendo de sua concentração.
2. Hemácias em meio hipoosmótico tratadas com esses detergentes apresentam alterações morfológicas, havendo mudança do padrão túrgido para crenado ou "cup-form".
3. A marcação de membranas eritrocitárias com o marcador lipídico 5-SASL, demonstrou ocorrer a partição dos monômeros do detergente na membrana, dependente da razão detergente:lipídio, em concentrações próximas da CMC do detergente.
4. O grau de formação de agregados polidispersos depende de elevadas concentrações de detergentes (alta razão detergente:lipídio) e correlaciona-se ao fenômeno hemolítico.
5. O fenômeno de proteção à lise visto através da difração de raios-X pode ser explicado como a distribuição do detergente, na sua forma

monomérica, na membrana eritrocitária, sem que haja alteração nos espaçamentos característicos da estrutura lamelar.

6. Existe grande similaridade entre a ação dos detergentes Tween e outro detergente não-iônico, o Triton X-100, na membrana eritrocitária, sendo entretanto os detergentes Tween mais efetivos como agentes deletérios à membrana.

7. O fenômeno lítico e as alterações morfológicas produzidas não se correlacionam com a lipoperoxidação lipídica, o que foi evidenciado pela não formação de MDA, pelo valor da CMC determinado para um dos homólogos, bem como pela ausência de auto-oxidação dos detergentes determinada iodometricamente.

8. Evidenciamos também através de eletroforese de "ghosts" tratados a ausência de interação dos detergentes testados às proteínas da membrana eritrocitária.

BIBLIOGRAFIA

ALMONG, S. , 1986. *Biochemistry*, 25 : 2597.

ARAKI, K. e RIFKIND, J. ,1981. *Biochem. Biophys. Acta*, 645 : 81.

AL-NAJJAR, A. R. ,1989. *J. Biol. Sci. Res.*, 20 : 85.

ATTWOOD, D. e FLORENCE, A.T., 1983. "Surfactant Systems- Their Chemistry, Pharmacy and Biology". 2a. ed, N.Y.London. Chapman and Hall, p.388.

AZAZ, E.; SEGAL.R. e MILO-GOLDZWEIG,I., 1981. *Biochim. Biophys. Acta*, 646 : 444.

AZMIN, M.N.; FLORENCE, A.T.; STUART, J.F.B. e WHATELEY, T.L., 1982. *J. Pharm. Pharmacol*, 36 : 36.

BIANCONI, L. , 1990. Tese de Doutorado. "Interações entre anestésicos locais e membranas lipídicas", São Paulo, Universidade de São Paulo.

BILLARD, G. e DIEULAFE, L. , 1904. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 56 :146.

- BJERRUM, O. J. e LUNDAHL, P. ,1974. *Biochim. Biophys. Acta*, 342 : 69.
- BLAUROCK, A. E. e NELANDER, J. C. ,1976. *J. Mol. Biol.*, 103 : 421.
- BRANLEY, A. T. e COLEMAN, R. ,1972. *Biochim. Biophys. Acta*, 290 : 219.
- BRANTON, D. ; COHEN, C. M. e TYLER, J. ,1981. *Cell*, 24 : 24.
- BRESTCHER, M. S. e RAFF, M. C. , 1975. *Nature*, 258 : 43.
- CAREY, M. C. , 1983. "Bile Salts in Gastroenterology". Barbara, L. ed.
Boston. MTP Press, p 19.
- CARRINGTON, A. e McLAUGHLAN, S. , 1976. "Introduction to magnetic
Ressonance". N.Y. Harper e Row, p 265.
- CASTANON, M. e WILKE, C. R. , 1981. *Biotechnol. Bioeng.*, 23 : 1365.
- CHIU, D; LUBIN, B. e SHOHET, S. B. , 1982. "Peroxidative reactions in Red
Cell Biology", Pryor, W. A. ed., *In Free radicals in Biology*, N.Y.
Academic Press, 5 : 119.
- COLEMAN, R. ,1977. *Methodol. Sur. Biochem.*, 6 : 163.
- CRISPENS, C. e SORRENSON, G. ,1988. *Anticancer Res.*, 8 : 1341.

CSORDAS, A. e SCHAUENSTEIN, K., 1984. *Biochem. Biophys. Acta.*, 769 : 571.

DACIE, J.V. e VAUGHAN, J., 1938. *J. Pathol. Bact.*, 46 : 341.

DODGE, J.R.C.; MITCHELL R.H. e HANAHAN, D.J., 1963. *Arch. Biochem. Biophys.*, 100 : 119.

DONBROW, M.; AZAZ, E e PILLERDORF, A., 1978. *J. Pharm Sci.*, 67 : 1676.

DULANEY, J.T. e TOUSTER, O., 1970. *Biochim Biophys. Acta*, 196 : 29.

FENDLER, J.H. e FENDLER, E., 1975. "Catalysis in Micellar and Macromolecular Systems" N.Y., London. Academic Press, p 204.

FENDLER, J. H., 1982. "Membrane Mimetic Chemistry". N.Y., John Wiley & Sons, p 204.

FIELD, D.L. e LEE, J.C., 1985. *Anal. Biochem.*, 144 : 584.

FINEAN, J.B.; COLEMAN, R. e MITCHELL R.H., 1984. "Membrane and their cellular functions". Oxford. Blackwell Scientific Publications, p 320.

FLORENCE, A.T.; TURCKER, I.G. e WALTERS, K.A., 1984. "Interactions of nonionic Polyoxyethylene Alkyl and Aryl Ethers with membranes and

- other Biological Systems".in Structure Performance Relationships in Surfactants Proceedings, p 405.
- FOSTER, D.M.; HAWKINS, C.F.; FIFE, D. e JACQUES, J.A., 1976. Chem. Biol. Inter., 14 : 265.
- FUJI, T., 1979. Biochem. Pharmacol., 28 : 613.
- GENNIS, R. B. (1989). "Biomembranes - Molecular Structure and Function". N.Y., Spring Verlag, Inc., p 95.
- HAJRATWALA, B.R. e TAYLOR, H., 1976. J. Pharm. Pharmacol., 28 : 934.
- HAMADA, T.; FURUYA, M. e HODATE, K., 1982. Experientia, 38 : 462.
- HAMADA, T. HODATE, K. e NAKAYAMA, E., 1984. Experientia, 40 :258.
- HAMES, B.O. e RICKWOOD, F., 1981. "Gel electrophoresis of proteins- a practical approach". Oxford. ICR Press. 290p.
- HANAHAN, D.J. e EKHOLM, J.E., 1974. Meth. Enzy., 32 : 168.
- HELENIUS, A. e SIMONS, K., 1975. Biochim. Biophys. Acta, 415 : 29.
- HELENIUS, A.; McCASLIN, D.R.; FRIES, E. e TANDFORD, C., 1979. Meth.

Enzy., 56 : 734.

HUBELL, W.L. e McCONNELL, H.M., 1971. J. Am. Chem. Soc., 93 : 314.

HUI, S.W.; STWART, C.M. e CHERRY, R.J., 1990. Biochim. Biophys. Acta.,
1023 : 335.

KITANI, T. e FUJIAMA, H., 1981. Eur. J. Biochem, 119 : 177.

KLAUSNER, R.D., 1984. Meth. Enzy., 104 : 340.

KUHLBRANDT, W., 1988. Quater Rev. Biophys., 21 : 4.

LAMMLI, V.K., 1970. Nature, 227 : 680.

LAYNE, E., 1957. Meth. Enzy., 3 : 450.

LEVINE, Y.K., 1972. Progr. Biophys. Mol. Biol., 24 : 1.

LEVY, G. e ANELLO, J.A., 1968. J. Pharm. Sci., 57 : 101.

LICHTENBERG, D.; ROBSON, R.J. e DENNIS, E. A. 1983. Biochim. Biophys.
Acta, 733 : 285.

LISSANT, K. J., 1974. "Emulsions and Emulsion Technology Part II".

Surfactant Science Series, (6) : 816.

MARCHESI, V. T., 1985. *Ann. Rev. Cell Biol.*, 1 : 531.

MERCK STANDARTS, 1972. E. MERCK publisher. Roelherdruck, p 304.

MUKERJEE, P. e MYSELS, K.J., 1970. "Critical micelles concentrations of aqueuos surfactant systems". *NSRDS-NBS* 36 : 375.

MYSELS, K.J. e MUKERJEE , P., 1979. *Pure Appl. Chem.*, 51 : 1083.

NEUGEBAUER, J., 1988. "A Guide to the Properties and Uses of Detergents in Biology and Biochemistry". *Calbiochem Corp.*, 95 p.

NICHOLLS, P. e SHONBAUM, G. R., 1963. " Catalases", Boyer, P ; Lardy, H. e Myrbäck, K, ed. In *The Enzymes*, N.Y., Academic Press, p 135.

NOVIKOFF, B. e HOLTZMAN, E, 1976. "Células e estrutura celular ". *Interamericana*, p 14.

NUNES-GARCIA, M. J. e VAZQUEZ, G., 1988. *Mar. Pollut. Bull.* 19 (2) : 66.

OHNISHI, S. e McCONNELL, H.M., 1965. *J. Am. Chem. Soc.*, 87 : 2293.

- PAPE, E.H., KLOTTE, K. e KREUTZ, W., 1977. Biophys. J., 19 : 141.
- PARRIS, C. N.; MASTERS, J. R. W.; WALKER, M. C.; NEWMAN, B.; RIDDLE, P.
e ENGLISH, P., 1987. Urol. Res., 15 : 17.
- RAWN, J. D., 1989. "Biochemistry", Neil Paterson Publisher, p 222.
- REISS-HUSSON, S. e LUZZATI, Z., 1964. J. Phys. Chem., 68 : 3504.
- ROTH, S. e SEEMAN, P., 1972. Biochim. Biophys. Acta, 225 : 207.
- ROTHMAN, J. E., 1977. Science, 195 : 743.
- ROUSER, G.; FLEISCHER, S. e YAMAMOTO, A., 1970. Lipids, 5 : 494.
- RYBCZYNSKA, M. e CSORDAS, A., 1989. Life Sci., 44 : 625.
- SANDERBERG H.E.; BRYANT, R.G. e PIETTE, L.H., 1969. Arch. Biochem.
Biophys., 133 : 144.
- SAMARAH, M. N. e GADALLA, M. A. F., 1987. Drug. Dev. Ind. Pharm., 13
: 93.
- SCHEREIER, S., POLNASZECK, C.F. e SMITH, I.C.P., 1978. Biochim.
Biophys. Acta, 515 : 375.

SCHEREIER, S., 1979 . Tese de Livre Docência. "Estudos estruturais e dinâmicos de membranas, pelo método de marcador de spin". São Paulo, Universidade de São Paulo.

SEEMAN, P., 1966. Biochem. Pharmacol., 15 : 1755.

SEEMAN, P. e WEINSTEIN J., 1966. Biochem. Pharmacol., 15 : 1737.

SHAKED, Z.; STEWART, T.; THOMSON, J.; THOMSON, J. W.; TAFORO, T. e
HERSHENSON, S., 1988. Eur. Pat. Appl., EP 270 : 799.

SHEETZ, M.P. e SINGER, J.S., 1974. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71 :
4456.

SHIMIZU, K. e IWATATSURU, M., 1990. Chem. Pharm. Bull., 38 : 744.

SINGER, S.J. e NICHOLSON, G.L., 1972. Science, 175 : 720.

SLINDE, E. e FLATMARK, T., 1976. Biochim. Biophys. Acta, 455 : 796.

STOCKS, J. e DORMANDY, T.L., 1971. Br. J. Haematol., 20 : 95.

STORCH, J. e KLEINFELD, A. M., 1985. Trends Biochem. Chem. Sci., 10 :
418.

- TAGESSON, C. e EDLING, C., 1985. Food Chem Toxicol., 22 : 861.
- TRAGNER, D. e CSORDAS, A., 1987. Biochem. J., 244 : 605.
- UMBREIT, J.N. e STROMINGER J.L., 1973. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70 : 2997.
- WATANABE, T.; KITABATARE, N.e DOI, E, 1988. Agric. Biol. Chem., 52 : 2517.
- WENNERSTROM, H. e LINDMAN, B., 1979. J. Phys. Chem., 23 : 2931.
- WERTZ, J. e BALTON, J.R., 1972. "Electron Spin Ressonance - elementary theory and practical applications". N.Y., McGrow Hill Inc.,p 446.
- WOODLAND, H. e HODGSON, R. H., 1987. Weed Sci., 35 : 52.
- ZASLAVSKY, B.Y.; OSSIPOV, N.N.; KRIVICH, V.S.; BAHOLDINA, L.P. e ROGOZHIN, S., 1978. Biochim. Biophys. Acta., 507 : 1.