

UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

PAULO SÉRGIO CASTILHO PRETÉ

"SOLUBILIZAÇÃO DE MEMBRANAS DE
ERITRÓCITOS POR SURFACTANTES DA SÉRIE
TWEEN"

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a)
<i>Paulo Sérgio Castilho Preté</i>
Prova da Comissão Julgadora.
<i>06/06/2000</i>

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular na área de Bioquímica.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Campinas, 2000



200013568

UNIDADE	B C
N.º CHAMADA:	TI Unicamp
	P919
V.	Ex.
TONBO BC/	42289
FROS.	16-278100
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	22/09/00
N.º CPD	

CM-00144213-7

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

P926s

Preté, Paulo Sérgio Castilho

Solubilização de membranas de eritrócitos por surfactantes da
série Tween/Paulo Sérgio Castilho Preté --
Campinas, SP:[s.n.], 2000.
103f: illus.

Orientador: Eneida de Paula

Dissertação(mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

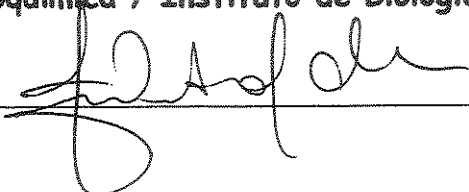
1. Detergentes. 2. Tween 3. Eritrócitos. 4. Hemólise. 5. Membranas

I. Paula, Eneida de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
III. Título.

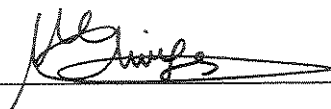
Data da Defesa: 06/06/2000

Banca Examinadora

Profa Dra Eneida de Paula (Orientadora)
Depto de Bioquímica / Instituto de Biologia / Unicamp



Profa Dra Maria Edwiges Hoffmann
Depto de Bioquímica / Instituto de Biologia / Unicamp



Profa Dra Sônia Valéria Pinheiro Malheiros
Depto de Biologia e Fisiologia / Faculdade de Medicina de Jundiaí



Profa Dra Nilce Correa Meirelles
Depto de Bioquímica/Instituto de Biologia/Unicamp

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Maneira de amar

O jardineiro conversava com as flores, e elas se habituaram ao diálogo. Passava manhãs contando coisas a uma cravina ou escutando o que lhe confiava um gerânio. O girassol não ia muito com sua cara, ou porque não fosse homem bonito, ou porque os girassóis são orgulhosos de natureza.

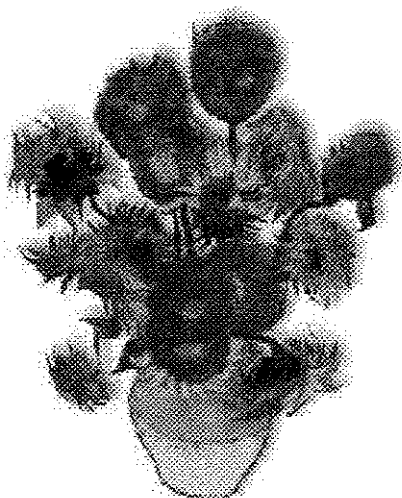
Em vão o jardineiro tentava captar-lhe as graças, pois o girassol chegava a voltar-se contra a luz para não ver o rosto que lhe sorria. Era uma situação bastante embaraçosa, que as outras flores não comentavam. Nunca, entretanto, o jardineiro deixou de regar o pé de girassol e de renovar-lhe a terra, na ocasião devida.

O dono do jardim achou que seu empregado perdia muito tempo parado diante dos canteiros, aparentemente não fazendo coisa alguma. E mandou-o embora, depois de assinar a carteira de trabalho.

Depois que o jardineiro saiu, as flores ficaram tristes e censuravam-se porque não tinham induzido o girassol a mudar de atitude. A mais triste de todas era o girassol, que não se conformava com a ausência do homem. "Você o tratava mal, agora está arrependido?" "Não", respondeu, "estou triste porque agora não posso tratá-lo mal. É a minha maneira de amar, ele sabia disso, e gostava."

Carlos Drummond de Andrade

*Dedicado as mais belas flores do meu
jardim... meu pai, que junto de Deus cultiva
os jardins do céu e a minha mãe, que junto
dos seus cultiva a mais bela das flores, o
AMOR...*



Agradecimentos

À minha família, que mesmo entendendo pouco do que faço me apoiou em todos os momentos e pela qual serei eternamente grato.

As minhas eternas mestras ou melhor doutoras, Ana Célia Ruggiero, Maria de Fátima Nepomuceno, Nilce Correa Meirelles e Eneida de Paula, minha mais profunda gratidão, respeito e admiração.

O meu mais profundo respeito e amor às pessoas que fizeram do convívio a mais doce experiência, Marizoca, Dani (japinha), Luciana, Leonardo, Vanessa, Daniela Lodetti, Alexandre, Mércia, Rafael, Marcelo, Juliana, Eleonora, Karina, Andréa, Eduardo, Granjeiro, Jack, Márcia, Roberta, Lígia, Alessandro, Danielle, Marina, Andréa, Mirian, Mário, Neto, Bayki, Ana Elci, Patrícia Paulino, Armindo e a amiga Helena pelas aulas de inglês.

À Dani, Dra. Mariza, Dra. Sônia, Dra. Satie, Dra. Nilce, Dra. Edwiges pela leitura e sugestões ao trabalho.

Aos bons e maus momentos vividos pelo grupo dos "CINCO".

Aos irmãos Parczamparc e demais irmãos que fizeram do convívio em casa (repúblicas) os mais doces momentos, Ed, Juli, Cae, Eneida, Lee, Stela, de Lucca, Luca, Patrícia, Cynthia, Marina e Zeca.

Ao "irmão" Zeca, pela ajuda nos momentos mais difíceis e principalmente pelo seu caráter, obrigado !

Aos alunos do curso de Enfermagem, que contribuíram com o meu desenvolvimento pedagógico. Em especial à minha eterna enfermeira e orientadora Eneida de Paula e ao Prof. Dr. Bayardo Baptista Torres que proporcionaram tal aprendizado.

"Amigos são anjos que nos deixam em pé quando nossas asas têm problemas em se lembrar de como voarem"

À CAPES, pela concessão da bolsa e ajuda financeira para o desenvolvimento do projeto.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS, ESQUEMAS E TABELAS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	14
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Surfactantes.....	19
1.2 Classificação dos Surfactantes.....	20
1.3 Propriedades Físico-Químicas dos Surfactantes.....	21
1.3.1 Concentração Micelar Crítica (CMC).....	21
1.3.2 Número de Agregação (N).....	22
1.3.3 Balanço Hidrofílico-Lipofílico (HLB).....	23
1.4 Propriedades e Aplicações dos Surfactantes da série Tween.....	25
1.4.1 Aplicações na Extração de Proteínas.....	26
1.4.2 Aplicações em Medicina.....	26
1.4.3 Aplicações na Indústria.....	27
1.5 Membranas.....	27
1.5.1 Membrana Eritrocitária.....	29
1.6 Interação de Surfactantes não-iônicos com Membranas.....	32
1.7 Hemólise.....	34
1.7.1 Hemólise Hipotônica.....	34
1.7.2 Hemólise Isotônica.....	35
1.8 Dano Oxidativo no Eritrócito.....	37
1.9 Hemoglobina.....	39
2. OBJETIVOS.....	43
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
3.1 Materiais.....	44

3.2 Métodos.....	44
3.2.1 Caracterização Óptica dos Surfactantes.....	44
3.2.2 Determinação da Autoxidação dos Surfactantes.....	44
3.2.3 Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC) dos Surfactantes através de Medidas de Tensão Superficial.....	45
3.2.4 Medidas de Pureza e Composição Química por Ressonância Magnética Nuclear (^1H -RMN).....	46
3.2.5 Preparo da Suspensão de Eritrócitos.....	48
3.2.6 Testes Hemolíticos.....	48
3.2.6.1 Em Meio Isotônico, medidos pela Liberação de Hemoglobina.....	48
3.2.6.2 Em Meio Isotônico: pela medida de Liberação de Potássio (K^+) Intracelular.....	49
3.2.6.3 Testes Hemolíticos em Meio Hipotônico (Proteção).....	49
3.2.6.4 Considerações Experimentais sobre os Ensaios Hemolíticos.....	50
3.2.7 Purificação e Determinação da Concentração de Hemoglobina em solução.....	51
3.2.8 Oxidação da Hemoglobina.....	52
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4.1 Caracterização dos Surfactantes.....	53
4.1.1 Análise Espectral dos Surfactantes (200-700nm).....	53
4.1.2 Teste de Autoxidação nos Estoques de Surfactantes.....	53
4.1.3 Determinação da CMC por Tensão Superficial.....	53
4.1.4 Ressonância Magnética Nuclear.....	56
4.2 Interações dos Surfactantes com Membranas Biológicas.....	61
4.2.1 Teste de Integridade Celular.....	61
4.2.2 Teste de Resistência a Hemólise.....	62
4.2.3 Testes Hemolíticos em Condições Isotônicas (Liberação de Hemoglobina)	63
4.2.4 Testes Hemolíticos em Condições Isotônicas (Liberação de K^+).....	72

4.2.4.1 Padronização das Medidas da Liberação de K ⁺	72
4.2.4.2 Medidas de Liberação de K ⁺ de Eritrócitos.....	73
4.2.5 Testes Hemolíticos em Condições Hipotônicas.....	78
4.3 Interação dos Surfactantes com a Hemoglobina.....	82
4.3.1 Padronizações dos Ensaios de Oxidação.....	82
4.3.2 Teste de Oxidação da Hemoglobina por Ação dos Surfactantes.....	83
5. CONCLUSÕES.....	88
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90
7. ANEXOS.....	106

ÍNDICE DE FIGURAS, ESQUEMAS E TABELAS

FIGURA	PÁGINA	TÍTULO
1	22	Representação esquemática de micela
2	25	Fórmulas estruturais dos surfactantes
3	28	Membrana biológica (modelo do mosaico fluido)
4	29	Representação esquemática da membrana eritrocitária
5	30	Distribuição dos fosfolipídios na membrana eritrocitária
6	32	Perfil de estabilidade de lipossomas frente ao surfactante
7	39	Estrutura da Protoporfirina IX
8	54	Determinação da CMC do Tween 80 por tensão superficial
9	56	Espectro de ^1H -RMN (500 MHz) do Tween 20 em D_2O
10	58	Espectro de ^1H -RMN (500 MHz) do Tween 40 em D_2O
11	59	Espectro de ^1H -RMN (500 MHz) do Tween 80 em D_2O
12	60	Espectro de ^1H -RMN (500 MHz) do Triton X100 em D_2O
13	61	Teste de integridade celular dos eritrócitos
14	62	Efeito do gradiente de NaCl na hemólise de eritrócitos
15	63	Efeito hemolítico do Tween 20 em condições isotônicas (Hb)
16	64	Efeito hemolítico do Tween 40 em condições isotônicas (Hb)
17	64	Efeito hemolítico do Tween 80 em condições isotônicas (Hb)
18	65	Efeito hemolítico do Triton X100 em condições isotônicas (Hb)
19	69	Variação de C^{sat} e C^{sol} em função da concentração lipídica
20	72	Curva padrão de KCl para medidas de liberação de K^+ intracelular.
21	73	Efeito hemolítico do Tween 20 em condições isotônicas (K^+)
22	74	Efeito hemolítico do Tween 40 em condições isotônicas (K^+)
23	74	Efeito hemolítico do Tween 80 em condições isotônicas (K^+)
24	75	Efeito hemolítico do Triton X100 em condições isotônicas (K^+)
25	78	Efeito hemolítico do Tween 20 em condições hipotônicas (Hb)
26	79	Efeito hemolítico do Tween 40 em condições hipotônicas (Hb)
27	79	Efeito hemolítico do Tween 80 em condições hipotônicas (Hb)
28	80	Efeito hemolítico do Triton X100 em condições hipotônicas (Hb)
29	82	Controle da Oxidação da hemoglobina com $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$
30	83	Formação de Met-Hb induzida por $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$
31	84	Oxidação da hemoglobina por Tween 20
32	84	Oxidação da hemoglobina por Tween 40
33	85	Oxidação da hemoglobina por Tween 80
34	85	Oxidação da hemoglobina por Triton X100
35	86	Formação de Met-Hb induzida pelos surfactantes
36	106	Tensiômetro Kruss K-12

TABELA		
I	23	Propriedades Físico-Químicas dos Surfactantes
II	55	Valores de CMC obtidos por Tensão Superficial (Tween e Triton X100)
III	67	Parâmetros quantitativos do efeito hemolítico (por liberação de Hb)
IV	76	Parâmetros quantitativos do efeito hemolítico (por liberação de K ⁺)
V	77	Comparação do efeito hemolítico medido por liberação de Hb e K ⁺
VI	81	Efeito Protetor dos Surfactantes sobre a Hemólise Hipotônica
VII	86	Razão Molar Surfactante:Hb na Oxidação de Hb Purificada

LISTA DE ABREVIATURAS

BPS	Sulfeto de benzil fenil
C ₁₂ E ₈	Polioxietileno 8 lauril éter
C ₁₄ E ₈	Polioxietileno 8 miristoil éter
C ₁₆ E ₈	Polioxietileno 8 palmitoil éter
C ⁱ	Concentração inicial da saída de K ⁺ (hemólise isotônica)
C ^{prot}	Concentração de proteção máxima, em ensaios de hemólise hipotônica
C ^{sat}	Concentração de saturação (início da hemólise isotônica)
C ^{sol}	Concentração de solubilização (100% de hemólise isotônica)
CMC	Concentração micelar crítica
CTAB	Brometo de cetil trimetil amônio
CHAPS	Cloroamidopropil dimetilamônio propano sulfonato
D ₂ O	Água deuterada
D _w	Solubilidade aquosa do surfactante
DTAB	Brometo de dodecil trimetil amônio
EROS	Espécies reativas de oxigênio
Hb	Hemoglobina
HLB	Balanco hidrofílico lipofílico
Ht	Hematócrito
MET-Hb	Metahemoglobina
MM	Massa Molecular
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
OXI-Hb	Oxihemoglobina
PBS	Tampão fosfato 5 mM, pH 7,4 com NaCl isotônico (154 mM)
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PS	Fosfatidilserina
Re	Razão efetiva droga/lipídio na membrana
R ^{prot}	Razão droga/lipídio na proteção contra lise hiposmótica
R ^{sat}	Razão droga/lipídio na saturação da membrana
R ^{sol}	Razão droga/lipídio na total solubilização da membrana
RMN	Ressonância magnética nuclear
RPE	Ressonância paramagnética eletrônica
SDBS	Dodecil benzeno sulfonato de sódio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SM	Esfingomielina
Triton X100	7-octilfenoxi polietoxi etanol
Tween 20	Polioxietileno-sorbitol monolaurato
Tween 40	Polioxietileno-sorbitol monopalmitato
Tween 80	Polioxietileno-sorbitol monooleato

RESUMO

Surfactantes apresentam efeito concentração dependente sobre membranas de eritrócitos, podendo proteger ou solubilizar essas membranas.

Neste trabalho estudamos a interação de surfactantes não-iônicos da série Tween (Polioxietileno-sorbitol) com membranas de eritrócitos humanos. Triton X100 (*t*-octilfenoxi polietoxi etanol), foi usado como controle para os ensaios hemolíticos.

Inicialmente fizemos a caracterização físico-química dos surfactantes através da determinação da CMC, e medidas de ^1H -RMN, que comprovaram a pureza e composição estrutural dos surfactantes.

Estudos hemolíticos em eritrócitos humanos (com suspensões de Ht de 5 - 20%) revelaram que os surfactantes da série Tween (20, 40 e 80) têm efeito protetor e lítico acima das suas respectivas CMCs (59, 27 e 12 μM), enquanto que com o Triton X100 estes efeitos ocorrem na faixa da sua concentração micelar crítica (0,25 mM).

O ensaio de proteção a hemólise foi feito em condições hipotônicas (77 mM de NaCl) e o de lise em condições isotônicas. Em ambos ensaios mediu-se fotometricamente a saída de hemoglobina (Hb), do eritrócito. Das concentrações de surfactante para proteção (C^{prot}), início (C^{sat}) e 100% de hemólise (C^{sol}) determinamos as razões molares surfactante:lipídio no eritrócito para proteção e lise (R^{prot} , R^{sat} , R^{sol} respectivamente).

Nos ensaios em condições isotônicas medimos também a liberação do K^+ intracelular (por potenciometria) como um método alternativo de quantificar a hemólise. Assim como as medidas de liberação de Hb, os ensaios de liberação de K^+ mostraram-se adequados aos estudos hemolíticos. Detectou-se uma estreita correlação entre os valores de C^{sat} e C^{sol} obtidos pelas duas técnicas, embora a liberação de K^+ ocorra em concentrações menores de surfactante, indicando que a saída de K^+ precede a de Hb, na hemólise.

Em concentrações muito altas esses surfactantes podem induzir a oxidação da Hb, sendo que o Tween 80 tem maior poder oxidante que os demais da série (Tween 80 > Tween 40 > Tween 20) e o Triton X100 não oxida a Hb. O efeito oxidante do Tween 80 impediu a determinação dos valores de R^{sol} em Ht mais altos.

O tratamento proposto por Lichtenberg (1985) para a quantificação da razão efetiva surfactante:membrana para solubilização não se mostrou adequado à análise do efeito hemolítico dos surfactantes da série Tween, cujos valores de R são muito altos, caracterizando-os como pouco hemolíticos.

ABSTRACT

Surfactants present hemolytic effects and depending on their concentration, they can either protect or solubilize erythrocyte membrane.

In this work we have studied the interaction of nonionic surfactants from the Tween series (polyoxyethylenesorbitan) with human erythrocytes membranes. Triton X100 (*n*-octylphenoxypolyethoxyethanol) was used as a control, in hemolytic assays.

To assure the purity and structural composition of the surfactants we employed CMC determination and ^1H -NMR characterization.

Hemolytic studies with human erythrocytes (Ht 5 - 20%) showed that surfactants from the Tween series (20, 40 and 80) have a protective and lytic effect upon the membrane above their respective CMCs (59, 27 and 12 μM), while Triton X100 presents those effects at its CMC range (0,25 mM).

The "protection" assays were carried out in a hypotonic media (NaCl 77mM) and the lysis experiments in isotonic conditions. In both assays Hb release from the erythrocyte was spectrophotometrically measured. From the surfactant concentrations for protection (C^{prot}), onset (C^{sat}) and 100% hemolysis (C^{sol}) we determined the surfactant:lipid molar ratios for protection and lysis (R^{prot} , R^{sat} , R^{sol} respectively).

At isotonic condition we measured also the release of intracellular K^+ (by potentiometry) as an alternative method for quantifying hemolysis. As well as Hb release measurements, the assays of K^+ -release showed to be quite adequate for the study of hemolysis. There is a good correlation between C^{sat} and C^{sol} values obtained

by the two techniques, although K^+ -release occurs at lower surfactant concentrations than Hb-release.

In extremely high concentrations, these surfactants induce Hb oxidation, being Tween 80 the one with the highest oxidative power, in comparison to the other Tweens (Tween 80 > Tween 40 > Tween 20). Triton X100 does not oxidise Hb. The oxidative effect of Tween 80 prevented the determination of R^{sol} values in the highest Hts.

The treatment proposed by Lichtenberg (1985) for the quantification of surfactant:membrane ratios for solubilization was not found adequate for the analysis of the hemolytic effect of Tweens, which R values are very high, characterizing them as weak solubilizers.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, estima-se que os organismos vivos estejam expostos a um número exorbitante de compostos químicos não endógenos (xenobióticos) sintetizados pelo próprio homem ou a produtos secundários desses, tais como medicamentos, corantes, detergentes, conservantes, flavorizantes da indústria alimentícia, agrotóxicos residuais em frutas e legumes e poluentes industriais que contaminam o ar, a água e o solo. A interação dos xenobióticos com o organismo vivo pode ser tanto benéfica quanto maléfica, a exemplo da atividade terapêutica dos medicamentos ou reações adversas (como a intoxicação) promovidas por esses mesmos agentes ao interagirem com os sistemas biológicos.

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

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

Na interface química-biologia, existem muitas aplicações para os surfactantes que se baseiam na sua interação com sistemas biológicos tais como: a) solubilização, extração de componentes estruturais das células, sejam hidrofóbicos como proteínas de membrana (Brenner *et al.*, 1995; Minuth *et al.*, 1995; Jones, 1999; Sun *et al.*, 1999; Vasilescu *et al.*, 1999) ou hidrofílicos (Huang & Lee, 1994; Chang *et al.*, 1994; Bassetti *et al.*, 1995; Forney & Glatz, 1995; Cummis & Ekeze, 1997), b) como agentes de dissolução de drogas e de facilitação de penetração de fármacos através de membranas (Israelachvili, 1985; Yoon & Burgess, 1996; Malcolmson *et al.*, 1998, Uchegbu & Vyas, 1998), c) no controle da atividade antimicrobiana (Restaino *et al.*, 1994; Cummis & Ekeze, 1997; Glover *et al.*, 1999). O aumento da permeabilidade da membrana vegetal a herbicidas, da molhabilidade de pesticidas durante a pulverização (Komives *et al.*, 1994; Riechers *et al.*, 1994) e da remoção de metais pesados (Huang & Lee, 1994) são alguns exemplos da aplicação específica desses surfactantes em agricultura.

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

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

Surfactantes biodegradáveis e sensíveis ao pH (BPS) são bons exemplos do avanço tecnológico nessa área; esses compostos, geralmente aminas lipofílicas com pK entre 5 e 7 tem pouca atividade detergente em pH fisiológico mas, quando endocitadas alcançam os lisossomos, cujo pH ácido promove a formação da forma carregada que é altamente lítica (Torchilin, 1998; Janetzko *et al.*, 1999). Ao romper o lisossomo esses surfactantes impedem ou diminuem a degradação precoce de medicamentos, que podem então exercer ação intracelular como na terapia com DNA (Liang & Hughes, 1998).

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

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

molécula, presença ou não de cargas e da natureza dos substituintes (Helenius & Simons, 1975).

Surfactantes não-iônicos permitem avaliar as interações hidrofóbicas entre seus monômeros ou agregados (micelas) e membranas porque não estabelecem ligações eletrostáticas com os componentes desta (Attwood & Florence, 1983). Os surfactantes da série Tween (polioxietileno sorbitol) enquadram-se nessa categoria.

1.1 Surfactantes

Tais compostos químicos têm uma natureza dual, possuindo uma porção hidrofóbica (solúvel em solventes apolares) e uma porção hidrofílica (solúvel em água). Em virtude da natureza anfipática dos surfactantes, suas moléculas migram para interfaces (porção hidrofóbica voltada para o ar ou para a fase apolar e porção hidrofílica voltada para a água) quando colocadas em solução, promovendo uma diminuição da tensão superficial da solução em relação à do solvente puro. O alinhamento das moléculas de surfactante nas interfaces reflete a tendência de assumir uma orientação termodinamicamente mais favorável (Attwood & Florence, 1983; Israelachvili, 1985).

A principal característica dos surfactantes é que, quando em solução aquosa diluída, apresentam-se em maior concentração na superfície do que no interior do líquido. Biologicamente, surfactantes iônicos como os sais biliares, derivados do colesterol (ácidos cólico, quenoxicólico, desoxicólico e litocólico) são os exemplos bioquímicos mais expressivos da atividade dos surfactantes. Os sais biliares fazem parte da bile e são excretados no duodeno promovendo a emulsificação das gorduras ingeridas, auxiliando na digestão enzimática e na absorção das gorduras da dieta (Montgomery, 1994). Esse fenômeno conhecido como adsorção ocorre em interfaces líquido/sólido, líquido/líquido e líquido/ar (Porter, 1991). Além dos sais biliares existem também os surfactantes pulmonares cuja função é reduzir a tensão superficial alveolar na interface líquido/ar e assim evitar o colapso dos pulmões que impediria a troca

gasosa. Os surfactantes pulmonares têm recebido bastante atenção dos pesquisadores pois sua produção deficiente é uma importante causa de mortalidade em recém nascidos (Jobe, 1993; Braun *et al.*, 1999). A administração, via respiratória, de surfactante pulmonar em recém nascidos portadores da Síndrome da Angústia Respiratória mostrou-se eficaz (Johannsson & Curstedt, 1997).

1.2 Classificação dos Surfactantes

Os surfactantes são também conhecidos como tensoativos ou detergentes. Tais compostos são classificados com base nas características e composição das suas porções polares e apolares. Em relação à porção hidrofílica, os surfactantes são classificados como: catiônicos, aniônicos, não-iônicos e zwitteriônicos (Neugebauer, 1994).

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

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

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

Zwiteriônicos: Comportam-se como aniônicos ou catiônicos, dependendo do pH do meio em que estão atuando. São N - alquil derivados de aminoácidos, utilizados em produtos de higiene pessoal (sabonete líquido, shampoos, géis), espuma para controle de incêndio, na limpeza industrial e de automóveis. (Ex: betainas, CHAPS).

A porção apolar ou hidrofóbica é geralmente composta por uma cadeia de hidrocarbonetos, podendo também conter moléculas como grupos aromáticos hidrofóbicos (Porter, 1991).

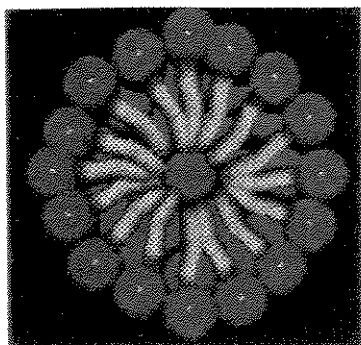
1.3 Propriedades Físico-Químicas dos Surfactantes

1.3.1 Concentração Micelar Crítica (CMC)

Surfactantes também exibem auto-agregação. Quando em baixa concentração em solução aquosa, eles se encontram como monômeros dispersos. Acima de uma faixa de concentração crítica (específica para cada tipo de surfactante), as moléculas de surfactante agregam-se formando estruturas denominadas micelas (Figura 1). Na figura 1A a porção azul representa a cabeça polar (hidrofílica) e a porção laranja representa a cauda apolar (hidrofóbica) do surfactante. A estreita faixa de concentração na qual se inicia a formação de micelas é denominada de concentração micelar crítica (CMC). A agregação em micelas é um evento que ocorre abruptamente e as moléculas de surfactante adicionadas a uma solução que já se encontre na sua CMC são incorporadas nas micelas (Tanford, 1980).

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

A)



B)

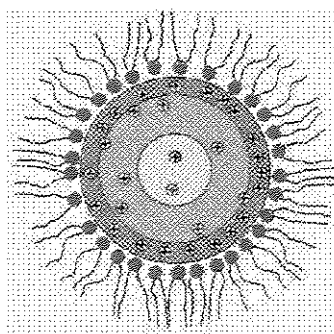


Figura 1 - Representação esquemática de A) Micela e B) Micela Reversa, formada em condições de baixa hidratação (<http://envirosan.com/s2micelles.htm>)

Muitos métodos são usados para medir a CMC, todos utilizando mudanças em uma propriedade mensurável do sistema. Como exemplos de métodos de determinação de CMC temos o do espalhamento de luz, o método da solubilização de corantes e o da tensão superficial (Attwood & Florence, 1983). A tensão superficial exerce um papel importantíssimo na físico-química das superfícies. A tensão superficial de um líquido é definida como a força que atua ortogonalmente a qualquer segmento unitário imaginado na superfície do líquido. Entretanto essa definição (embora apropriada ao caso de filmes líquidos, como as espumas) conduz a erros, pois não existe uma membrana elástica ou uma força tangencial como tal na superfície de um líquido puro. É mais conveniente definir tensão superficial e energia livre superficial como o trabalho necessário para aumentar a superfície em uma unidade de área, por um processo isotérmico e reversível (Schick, 1987).

1.3.2 Número de Agregação (N)

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

micelas são estruturas dinâmicas, já que a troca de monômeros entre elas e a fase aquosa ocorre constantemente (Wennerstron & Lindman, 1979). No entanto os valores de N indicam o tamanho e a estabilidade dos agregados micelares, podendo chegar a valores muito altos ou a valores de 2-4 como no caso de sais biliares e alguns fármacos (Schreier *et al.*, 2000).

1.3.3 Balanço Hidrofílico-Lipofílico (HLB)

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

A tabela I mostra algumas propriedades físico-químicas de surfactantes não-iônicos estudados como: MM (Massa Molecular), HLB e CMC.

Tabela I - Propriedades Físico-Químicas de alguns Surfactantes não-iônicos

Surfactante	MM	HLB	CMC (M)
$C_{12}E_8^{(a)}$	539	13,1	$8,3 \times 10^{-5}$
$C_{14}E_8^{(a)}$	567	13,04	$7,6 \times 10^{-6}$
$C_{16}E_8^{(a)}$	595	12,42	$5,1 \times 10^{-7}$
C_9E_9 (Renex 95) ^(b)		13,0	$7,5 \times 10^{-5}$
C_9E_{20} (Renex 200) ^(b)		16,1	$1,1 \times 10^{-5}$
C_9E_{100} (Renex 1000) ^(b)		19,0	$7,5 \times 10^{-4}$
Tween 20 ^(c)	1228	16,7	$5,9 \times 10^{-5}$
Tween 40 ^(c)	1288	15,6	$2,7 \times 10^{-5}$
Tween 80 ^(c)	1310	15,0	$1,2 \times 10^{-5}$
Triton X100 ^(c)	625	13,5	$2,5 \times 10^{-4}$

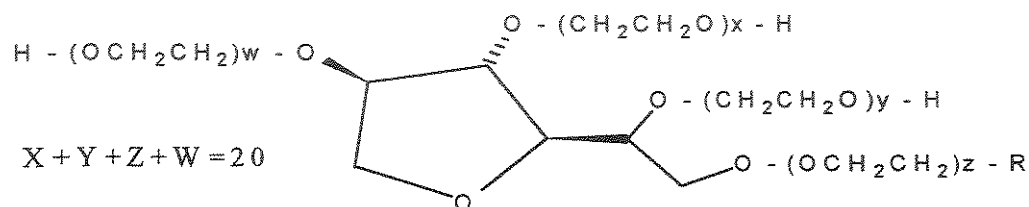
Segundo: a) Hinze & Pramauro (1993), b) Galembeck *et al.*, (1998) e c) Helenius *et al.*, (1979).

Em geral, dentro de uma série homóloga, quanto maior o HLB, maior a CMC dos surfactantes. Os Tweens são surfactantes bastante hidrofílicos porém essa característica não é refletida diretamente em seus valores de CMC, que são bem menores que os do Triton X100. Nesse caso é preciso considerar o arranjo espacial da molécula considerando não só a porção hidrofóbica mas a influência do volume ocupado pela parte hidrofílica que favorece a micelização: os Tweens têm 3 braços hidrofílicos para uma cauda hidrofóbica, característica essa que favorece sua micelização, enquanto os Tritons têm uma única cauda hidrofílica e outra hidrofóbica (Figura 2).

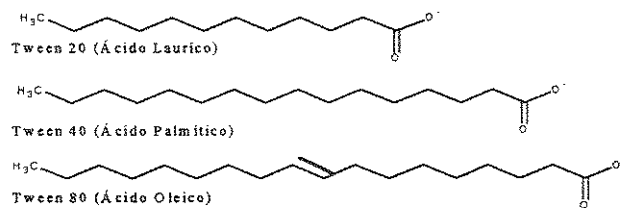
1.4 Propriedades e Aplicações dos Surfactantes da Série Tween

Tween é o nome comercial dado aos surfactantes derivados do polioxietileno-sorbitol, onde o número de grupos polioxietileno é constante (20), variando a composição da cadeia de hidrocarbonetos (Cross, 1987; Schick, 1987)). Dentro desta série, foram escolhidos três homólogos para estudo: Tween 20, derivado do ácido láurico ($C_{12:0}$); Tween 40, derivado do ácido palmítico ($C_{16:0}$) e o Tween 80, derivado do ácido oléico ($C_{18:1}$). A figura 2 mostra também a estrutura de um outro surfactante não-iônico, o Triton X100, que é um potente solubilizador de membranas e cuja parte hidrofílica é formada por polioxietilenos (Bielawski *et al.*, 1995).

A)



R=



B)

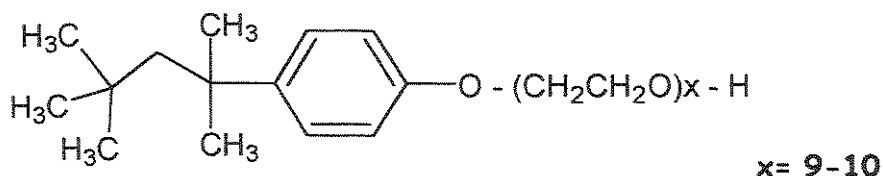


Figura 2 - Fórmula estrutural dos surfactantes A) Série Tween e B) Triton X-100.

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

1.4.1 Aplicações na Extração de Proteínas

Os surfactantes da série Tween apresentam emprego muito variado. Surfactantes não-iônicos com cabeças polares do tipo polioxietileno, ao contrário da maioria dos surfactantes encontrados, não desnaturam proteínas, podendo dessa forma ser usados para solubilização e caracterização de proteínas membranares (Neugebauer, 1994) e globulares (Watanabe *et al.*, 1988; Petrunyaka & Severina, 1992; Sun *et al.*, 1999). Kitani & Fujisawa (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. Watanabe e col. (1988) demonstraram que o Tween 20 podia prevenir completamente a desnaturação causada por congelamento na miosina de músculo estriado de ratos.

1.4.2 Aplicações em Medicina

Quanto ao emprego terapêutico e farmacológico os surfactantes não-iônicos da série Tween têm sido utilizados como coadjuvantes em preparações medicamentosas anticancerígenas (Taniguchi *et al.*, 1988; Hill *et al.*, 1995; Uchegbu & Vyas, 1998), antibacterianas (Rahaman *et al.*, 1998) e como estabilizadores de preparações injetáveis contendo, por exemplo, insulina (Choudhari *et al.*, 1994). Crispends & Sorrenson (1988) descreveram a ação anticarcinogênica do Tween 80 no tratamento do sarcoma de células reticulares de camundongos. Estudando a ação de um anti-epilético, Samaha & Gadalla (1987) descobriram que os Tweens 20, 40 e 80 podiam aumentar a solubilidade e

eficácia do mesmo. Estes surfactantes são usados também como agentes estabilizadores de medicamentos injetáveis (Shaked *et al.*, 1988; Choudhari *et al.*, 1994) e em preparações de antibióticos (Al-Najjar, 1989; Rahaman *et al.*, 1998). Al-Najjar (1989) demonstrou que os Tweens são capazes de reduzir a concentração mínima inibitória de pelo menos quinze antibióticos usados contra infecções cutâneas ocasionadas por *Staphylococcus aureus*.

1.4.3 Aplicações na Indústria

Além dos estudos realizados com finalidades de pesquisa bioquímica e farmacêutica, como exemplificado acima, observa-se a aplicação dos Tweens na indústria alimentícia, na agricultura, no combate à poluição e na reutilização de recursos naturais (biodegradação). Os Tweens 10 e 60 são amplamente usados como aditivos de preparações alimentícias (Tagesson & Edling, 1985; Degman *et al.*, 1993), embora haja indícios que tais compostos aumentem também a permeabilidade do trato intestinal a moléculas potencialmente tóxicas e patogênicas. Quanto ao seu emprego em recursos naturais, temos como exemplo o trabalho realizado por Castanon & Wilke (1981) sobre a hidrólise enzimática de papel jornal. Neste estudo ficou provado que o Tween 80 aumenta a taxa e a extensão da sacarificação da celulose de forma a aumentar o rendimento e a recuperação da enzima imobilizada.

Em cosméticos os surfactantes da série Tween têm sido utilizados principalmente no preparo de emulsões para aplicação tópica (Bergh *et al.*, 1997; Benassi *et al.*, 1999).

1.5 Membranas

A membrana plasmática é a barreira entre o citoplasma da célula e o ambiente externo que controla a passagem de metabólitos e de solutos em geral de um meio para outro. Em células de mamíferos ela é a única barreira, enquanto células de plantas e bactérias também possuem uma parede celular que mantém a integridade celular, apesar

do transporte ainda ser controlado primariamente pela membrana plasmática. Basicamente as membranas biológicas são constituídas de lipídios, proteínas e carboidratos (que aparecem em menor quantidade e são encontrados na forma de glicoproteínas ou glicolípídios).

As membranas podem ser descritas pelo modelo do mosaico fluído proposto por Singer e Nicolson (1972), mostrado esquematicamente na figura 3. Neste modelo, o mais amplamente aceito hoje em dia, os lipídios se organizam em forma de bicamada, e as proteínas permeiam essa estrutura constituindo um arranjo extremamente dinâmico (Gennis, 1989).

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

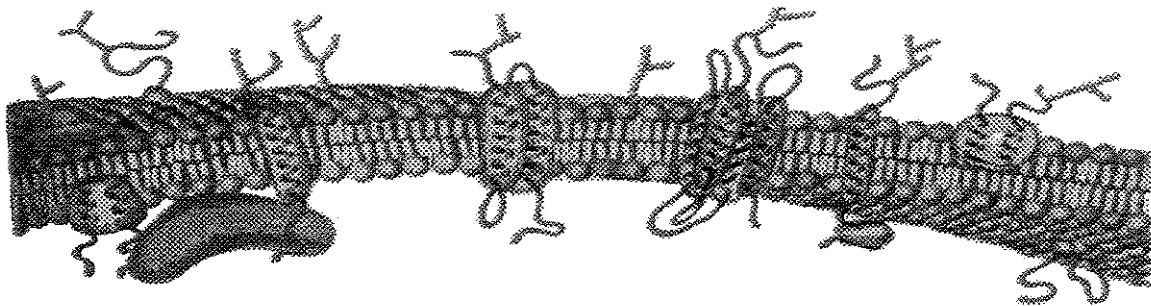


Figura 3 - Representação de uma membrana biológica segundo o Modelo do Mosaico Fluído de Singer & Nicolson de 1972 (Garret & Grisham, 1995).

1.5.1 Membrana Eritrocitária

O eritrócito de mamíferos, célula vermelha do sangue, é uma célula anucleada de forma discóide bicôncava que contém hemoglobina em concentração elevada (cerca de 5 mM/célula, Bull *et al.*, 1990). Para cumprir a função de transportar a hemoglobina e levar oxigênio a todas as células, o eritrócito percorre todos os vasos sanguíneos do organismo aproximadamente 500.000 vezes, durante sua vida média de 120 dias (Bull *et al.*, 1990) e é capaz de transpor capilares e sinusóides de diâmetros de 3 a 4 μm , que correspondem a metade de seu próprio diâmetro, de 7 a 9 μm (Scherier, 1985; Bull *et al.*, 1990). Tais fenômenos só são possíveis graças a extrema resistência e deformabilidade da membrana do eritrócito (Lux, 1988).

A membrana do eritrócito (Figura 4), devido a sua facilidade de obtenção e isolamento, tem sido extensivamente estudada e suas características principais são bastante conhecidas, sendo portanto um ótimo modelo para o estudo de membranas mais complexas, e de outros tipos de células (Laurialt & OBrien, 1991). A proporção, em peso, de proteínas:lipídios:carboidratos é 49:43:8 nessas membranas (Montgomery, 1994).

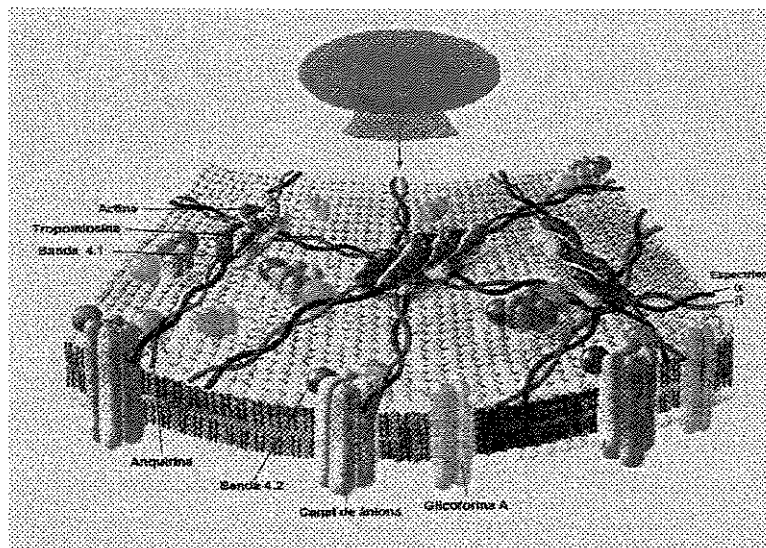


Figura 4 - Representação esquemática da face interna membrana eritrocitária (Voet & Voet, 1990).

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

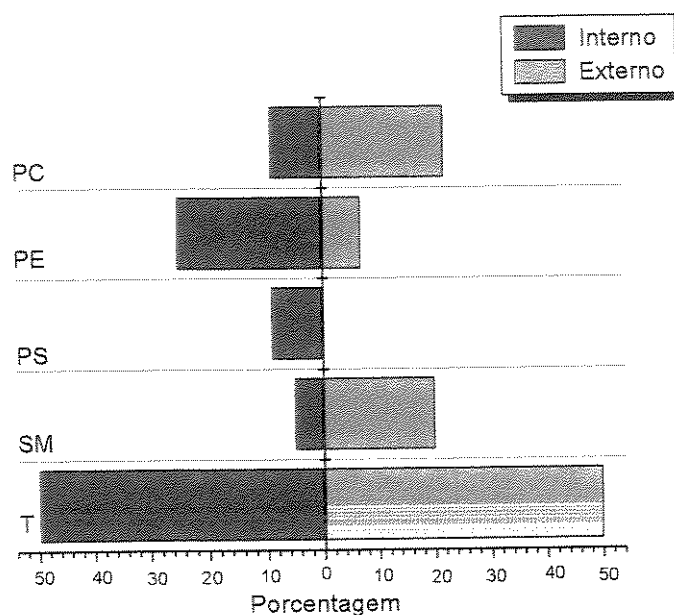


Figura 5 - Representação gráfica da distribuição dos fosfolípidios na bicamada eritrocitária. PC (fosfatidilcolina), PE (fosfatidiletanolamina), PS (fosfatidilserina) e SM (Esfingomielina) (Garrett & Grisham, 1995).

Os mecanismos responsáveis pela manutenção dessa assimetria são: i) a interação preferencial de fosfolípidios com proteínas da membrana (principalmente com a espectrina), fixando esses compostos na monocamada interna e ii) a existência de

translocases (ou flipases) responsáveis pela translocação específica, ATP-dependente, dos fosfolipídios com distribuição assimétrica entre as monocamadas externa e interna (Middelkoop *et al.*, 1988; Devaux, 1991; Wilson *et al.*, 1993).

Os lipídios orientam-se na bicamada expondo sua parte polar ao meio aquoso (Connor *et al.*, 1990) como mostra a figura 4. As proteínas intrínsecas têm uma porção hidrofóbica que interage com os lipídios, atravessando a bicamada. A maioria das proteínas extrínsecas da membrana eritrocitária está envolvida na formação de um extenso retículo submembranar, que se projeta para o lado citoplasmático da membrana (Figura 4), formando o citoesqueleto eritrocitário. O citoesqueleto eritrocitário é composto por actina, proteína 4,1 (banda 4,1) e espectrina, sendo esta última o seu principal componente. A conexão entre as proteínas intrínsecas e a espectrina do citoesqueleto é feita por uma família de proteínas chamadas anquirinas. A interação da membrana com a espectrina seria responsável pela manutenção da integridade da célula na circulação sanguínea (Platt *et al.*, 1993, 1995). Interações eletrostáticas parecem estar envolvidas na interação da espectrina com a membrana (Kahana *et al.*, 1991), enquanto a existência de regiões hidrofóbicas na molécula sugere que essas também sejam importantes para a manutenção da forma do eritrócito (Streichman *et al.*, 1991).

Além do citoesqueleto, a membrana do eritrócito possui em sua face externa uma outra particularidade: o glicocálix, composto pela glicoforina (proteína intrínseca cuja única cadeia polipeptídica está associada a 16 resíduos de monossacarídeos) e outras glicoproteínas e glicolipídios. Essa região, bastante hidrofílica pela característica dos grupamentos OH dos açúcares, tem espessura de 100 nm, isto é 20 vezes maior que o da própria bicamada lipídica (Lehninger *et al.*, 1993), e constitui uma "barreira adicional" ao eritrócito. É importante considerar essas características da membrana eritrocitária quando se estuda a ação de surfactantes não-iônicos sobre a mesma. Estes surfactantes parecem conferir uma proteção externa contra a lise de eritrócitos e lipossomos (Ribas, 1997; Galembeck *et al.*, 1998;) parecida com a do envoltório hidrofílico do glicocálix.

1.6 Interação de Surfactantes não-iônicos com Membranas

Edwards & Almgren (1990) descrevem 3 fases na interação de surfactantes não-iônicos com membrana lipídica.

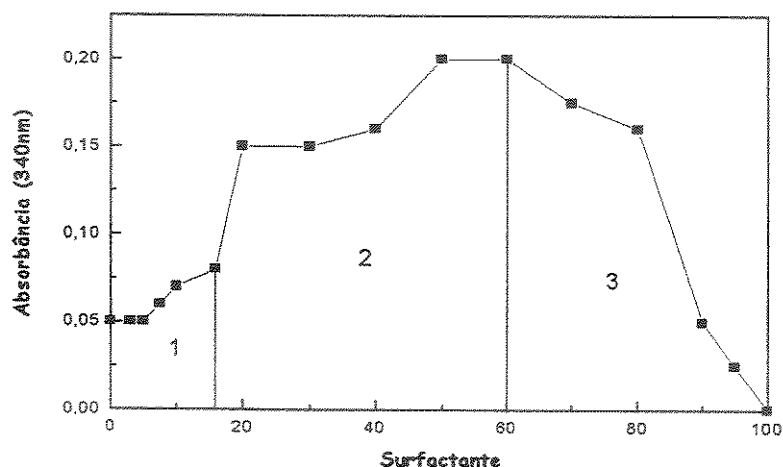


Figura 6 - Perfil de estabilidade de lipossomas convencionais sonificados em função da concentração de surfactante (Edwards & Almgren, 1990).

Na primeira etapa, marcada pela baixíssima concentração de surfactantes, o tamanho das vesículas (que pode ser acompanhado pelo aumento na dispersão de luz), permanece aproximadamente igual ao inicial, sugerindo que as moléculas de surfactantes intercaladas não causam grandes modificações nas vesículas. Na segunda etapa, monômeros do surfactante são incorporados na bicamada causando aumento da área total. Na terceira etapa, após uma razão crítica surfactante:lipídio, acontece o rompimento da membrana e a formação de micelas mistas (Edwards & Almgren, 1990). A figura 6 demonstra a medida dessas três etapas na solubilização de lipossomos por $C_{12}E_5$ (Santana *et al.*, 1993).

Essa descrição revela detalhes da interação molecular dos surfactantes não-iônicos com a bicamada lipídica que acreditamos ser a responsável pelo efeito dessa classe de surfactantes em membranas biológicas. A troca de monômeros (surfactante e fosfolipídios) nas fases 1 a 3 justifica a extração indireta de proteínas membranares

(Bangham & Lea, 1978; Pratt & Cook, 1979; Loizaga *et al.*, 1979; Neugebauer, 1994; Molloy *et al.*, 1998), DNA (Cummis & Ekeze, 1997) e também a solubilização da membrana (rompimento).

Conhecer a interação dos surfactantes com membranas biológicas é muito importante para definir possíveis aplicações dessas moléculas. Vários autores têm investigado essa interação no que diz respeito à hemólise. Isomaa e col. (1986) estudaram as alterações de permeabilidade induzida por anfifílicos com diferentes comprimentos da cadeia alquila, em eritrócitos humanos. Trägner & Csordas, (1987) observaram um efeito bifásico (proteção e hemólise) na interação dos surfactantes da série Triton com membranas de eritrócito. Ohnishi & Sagitani (1993) estudaram o efeito da estrutura de surfactantes não-iônicos com cadeia de polióxido de etileno em relação à hemólise e observaram que a atividade hemolítica desses surfactantes diminui com o aumento da cadeia de polióxido de etileno.

Em nosso laboratório, Ramos (1991) demonstrou que o Tween 20, 40 e 80 apresentam comportamento bifásico em relação à lise de eritrócitos de rato, resultado também observado por Bielawski e col. (1995) com o Tween 80 utilizando eritrócitos humanos. Galembeck e col. (1998), demonstraram que surfactantes da série Renex, definidos quimicamente como nonilfenóis polietoxilados (surfactante não-iônico) apresentam comportamento bifásico em relação à lise de eritrócitos, dependendo da concentração e da estrutura das suas cadeias laterais. Entre os três surfactantes da série Renex estudados, o Renex 95 apresentou maior efeito hemolítico em meio isotônico. O Renex 200 não apresentou propriedade hemolítica ou protetora e o Renex 1000 apresentou uma eficiente ação protetora à hemólise provavelmente devido à cadeia de polióxido de etileno (POE) ser muito grande, podendo formar de uma capa protetora ao redor do eritrócito. Através da técnica de RPE e utilizando como marcador o ácido 5-doxil esteárico, Galembeck e col. (1998), avaliaram a fluidez de ghosts de eritrócitos pela estimativa do parâmetro de ordem (S) e observaram que os três surfactantes utilizados (Renex 95, 200 e 1000), aumentam a fluidez dessas membranas,

mas ressaltam que os marcadores utilizados diferem entre si, quanto a localização preferencial, enquanto que para o Renex 95 os marcadores distribuem-se entre as micelas mistas formadas entre surfactante e fosfolipídios, para os Renex 200 e 1000 os marcadores encontram-se nas micelas formadas apenas pelos surfactantes.

Estudos preliminarmente feitos com os surfactantes Tween em nosso laboratório levantaram muitas questões que inspiraram o desenvolvimento desta dissertação de mestrado. Medidas de RPE com marcadores de spin do tipo doxil estearato mostraram a solubilização da membrana eritrocitária por Tween pela diminuição do parâmetro de ordem (Ramos, 1991). As medidas de RPE foram feitas com altas concentrações de membrana, o que nos levou a planejar ensaios hemolíticos com Ht superiores a 5%.

1.7 Hemólise

1.7.1 Hemólise Hipotônica

A lise hipotônica dos eritrócitos leva à perda de conteúdo celular. A hemoglobina (Hb) e outras proteínas citoplasmáticas extravazam através de poros que se formam na membrana plasmática. Esses poros resultam de rupturas criadas quando a pressão interna gerada pela osmose rápida torna-se muito alta para ser suportada pela membrana (Chasis & Shohet, 1987). Medidas cinéticas da lise de eritrócitos humanos, utilizando pulsos elétricos, sugerem que a ruptura da membrana acontece em três etapas consecutivas: i) vazamentos dos íons, ocasionando um desbalanceamento osmótico que, conseqüentemente, leva à ii) hemólise coloidal da membrana e à iii) formação de poros que têm um diâmetro médio de menos que 50nm (Lee *et al.*, 1985).

Embora todo o conteúdo citoplasmático seja perdido na ruptura, indicando que a barreira membranar tenha sido destruída, a membrana ainda consegue reter muito da sua integridade e composição. Exemplo disso é que com aumento de temperatura (até 40°C) a membrana pode, espontaneamente, recuperar suas propriedades por re-selagem ("resealing"), já que nesta operação o citoesqueleto protéico é preservado (Connor *et al.*, 1990). Se a lise ocorre em temperatura fisiológica (37°C), o tempo de vida dos poros

é muito curto (alguns segundos), mas a 4°C eles permanecem na membrana por várias horas. Postulou-se que os poros representam regiões de descontinuidade na matriz lipídica da membrana eritrocitária (Lee *et al.*, 1985).

Schrier e col. (1992), utilizando marcadores de spin derivados dos glicerofosfolipídios, observou que a lise hipotônica é acompanhada por uma redistribuição dos fosfolipídios entre as monocamadas. A mudança na forma das linhas dos espectros de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) mostrou que, após a hemólise, a monocamada mais rígida (a externa) torna-se mais fluída, enquanto o inverso ocorre com a monocamada interna, que se organiza. Esses autores observaram também que, após a restauração das membranas, na presença de Mg-ATP, a assimetria transmembranar dos fosfolipídios foi restabelecida.

1.7.2 Hemólise Isotônica

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

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

Hägerstrand & Isomaa (1989) descreveram o fenômeno hemolítico que acompanha a partição de moléculas anfipáticas em membranas naturais e artificiais de modo bastante interessante, considerando que a membrana de eritrócitos pode incorporar uma grande quantidade de anfifílicos sem perder sua integridade e propriedades de barreira. A intercalação de anfifílicos na membranas seria no entanto, associada a grandes rearranjos no interior da bicamada lipídica. Assim, ao se intercalar na membrana, os anfifílicos disparariam o aparecimento de uma fase transiente, decorrente de uma redistribuição rápida das moléculas do anfifílico bem como dos lipídios da bicamada. Em concentrações sublíticas altas ocorreria um processo adicional, envolvendo a liberação de vesículas ("budding"). Aceita-se que uma mudança na forma dos eritrócitos para a forma equinocítica ou estomatocítica seja um pré-requisito para ocorrer, respectivamente, uma exo ou endovesiculação. Em concentrações ainda mais elevadas a estrutura da bicamada colapsa e a célula é lisada.

Tem-se demonstrado que um número imenso de compostos anfifílicos pode induzir hemólise em condições isosmóticas. Assim, a ação de álcoois (Seeman *et al.*, 1970; Castro *et al.*, 1990; Chi & Wu, 1991), surfactantes (Helenius & Simons, 1975; Isomaa *et al.*, 1986; Trägner *et al.*, 1987; Ohnishi & Sagitani, 1993; Chernitsky &

Senkovich, 1997; Galembeck *et al.*, 1998), peptídeos (Ramalingam & Bello, 1992), sais de sílica (Macnab & Harington, 1967), ciclodextrinas (Weisz *et al.*, 1993; Irie & Uekama, 1997), fenotiazínicos (Lieber *et al.*, 1984, Malheiros *et al.*, 1998), lisofosfatidilcolina (Weltzien, 1979), gramicidina (Katsu *et al.*, 1989), antihelmínticos (Malheiros *et al.*, 2000), anestésicos locais (Seeman & Roth, 1972; Malheiros *et al.*, 2000), sobre eritrócitos têm sido objeto de estudo na tentativa de elucidar o mecanismo de indução de hemólise. Em todos esses casos a intercalação física do composto na bicamada leva à desestabilização e ruptura da membrana.

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

Lichtenberg (1985) propôs uma metodologia que permite analisar quantitativamente o efeito hemolítico induzido por surfactantes e outros xenobióticos. A metodologia determina a razão efetiva droga/lipídio na membrana (R_e) para proteção, saturação ou solubilização da membrana eritrocitária. Além de permitir o cálculo da razão droga/lipídio, a metodologia proposta por Lichtenberg permite o cálculo de outros parâmetros como a CMC e da constante de ligação (K_b) do surfactante à membrana.

1.8 Dano Oxidativo ao Eritrócito

O dano oxidativo dos componentes celulares tem sido estabelecido como um fator importante em várias condições patológicas. Os eritrócitos são particularmente

susceptíveis ao dano oxidativo como resultado do alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados das suas membranas e da alta concentração celular de oxigênio e hemoglobina (Hb), que são poderosos promotores de processos oxidativos (Clemens & Waller, 1987). Sob condições normais os eritrócitos são continuamente expostos a espécies reativas de oxigênio (EROS) de fontes internas e externas. No interior do eritrócito, estima-se que mais de 3% da oxi-Hb (forma oxigenada ou Fe II) seja convertida em meta-Hb (Fe III) com a concomitante produção de radicais superóxido ($O_2^{\cdot -}$) (Van den Berg *et al.*, 1991).

Em eritrócitos sadios o dano oxidativo é prevenido por um eficiente sistema protetor constituído por uma série de enzimas e compostos antioxidantes que incluem as enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase, além da glutathione reduzida, vitamina E e C. Assim, as EROS mais reativas, que são formadas no citosol com participação da Hb, são detoxificadas antes que possam atingir a membrana celular, onde, através do dano oxidativo, poderiam comprometer a integridade da célula (Halliwell & Gutteridge, 1989). No entanto, uma pequena quantidade de EROS pode atingir a face interna da membrana celular (Van den Berg *et al.*, 1991) e a exposição freqüente dos eritrócitos ao contato com células metabolicamente ativas (fagócitos, por exemplo) pode contribuir para a manutenção de um contínuo estresse oxidativo na membrana dos eritrócitos, devido a constante produção de H_2O_2 . Muitos tipos de eritrócitos patológicos também possuem susceptibilidade aumentada ao estresse oxidativo. Um exemplo é a deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase, que compromete a via das pentoses no eritrócito, diminuindo a formação de equivalentes redutores (NADPH), que serve como doador de elétrons e prótons para a redução da glutathione oxidada e consequente produção de glutathione reduzida. Além disso, em várias patologias que envolvem hemoglobinas anormais, verifica-se um aumento do dano oxidativo, que acelera a destruição dos eritrócitos (Chen & Huestis, 1997; Dincer *et al.*, 1999).

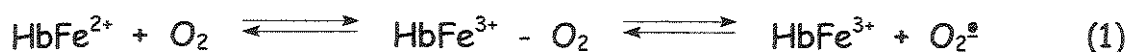
A principal função da Hb é o transporte de O_2 . Em organismo superiores a Hb provê o aporte de O_2 a todas as células (necessário para o metabolismo aeróbio) através da circulação. Assim essa molécula versátil é capaz de ligar-se reversivelmente ao O_2 em função da oferta do gás e aumentar em ordens de grandeza a capacidade de transporte de oxigênio dentro dos organismos.

Quando a hemoglobina liga-se ao oxigênio, um elétron é polarizado do ferro para o oxigênio, formando momentaneamente a forma férrica ($HbFe^{3+}$). Em condições normais este elétron é devolvido ao ferro no momento em que o oxigênio é liberado, restabelecendo sua forma ferrosa ($HbFe^{2+}$) (Antonini & Brunori, 1975).

O estado reduzido do ferro no grupamento heme (Fe^{2+}) é fundamental para a realização do transporte de oxigênio. Alguns resíduos invariáveis, de natureza hidrofóbica, são responsáveis pela manutenção do ambiente não polar em torno do sítio de ligação do oxigênio que é a base para a estabilidade do complexo ferro-oxigênio (Antonini & Brunori, 1975). Qualquer alteração no ambiente do heme pode levar à formação de meta-Hb. Por exemplo Cauchey (1967) demonstrou que a velocidade de autooxidação da Hb é maior quando a histidina distal está substituída por outros resíduos, caracterizando assim, a importância deste aminoácido na estabilidade do estado de oxidação do ferro no heme, garantindo a ligação da Hb com o oxigênio.

Em indivíduos normais, aproximadamente 3% da hemoglobina total circulante é convertida diariamente a meta-Hb, como dito anteriormente. Fisiologicamente, a meta-Hb presente na célula é reduzida pela enzima metahemoglobina redutase que utiliza o NADPH como fonte redutora (Kurata *et al.*, 1993).

Com a formação da meta-Hb ocorre simultaneamente a formação de ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) de acordo com a reação (1):



Sendo assim, devido ao processo contínuo de oxigenação e desoxigenação da Hb, o ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) é continuamente gerado no interior do eritrócito. É conhecido que este radical livre pode atacar direta ou indiretamente componentes das membranas, DNA e hormônios (Kurata *et al.*, 1993; Martinez *et al.*, 1995; Cardozo-Pelaez *et al.*, 2000).

O ânion superóxido, quando não reage com macromoléculas celulares, pode, por processo de dismutação (reação 2), gerar peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Nagabadu & Rifkinf, 1998). Esta reação é catalisada pela enzima superóxido dismutase (Misra & Fridovich, 1972; Winterbourn & Metodiewa, 1999), presente em altas concentrações no eritrócito:



No eritrócito, o $O_2^{\bullet -}$ promove grandes danos quando interage com o peróxido, produzindo intermediários altamente reativos, como o radical hidroxila (Peuchant *et al.*, 1997). Os radicais produzidos podem, então, atacar os lipídios e proteínas da membrana resultando em hemólise e perda da função celular.

Por apresentar ferro em sua estrutura, a hemoglobina pode ainda comportar-se como um reagente biológico de Fenton, sendo assim, uma molécula com grande potencial promotor de processos oxidativos (Clemens & Waller, 1987; Puppo & Halliwell, 1988; Winterbourn, 1995).

Em adição à capacidade da hemoglobina gerar o ânion superóxido, os processos oxidativos no interior dos eritrócitos são favorecidos pela alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados da membrana citoplasmática, rico suprimento de oxigênio e presença de metais de transição. Como o eritrócito maduro é anucleado, ele é incapaz de substituir componentes celulares danificados por processos oxidativos e, portanto, a consequência é a morte (lise) celular (Konukoglu *et al.*, 1998).

Em condições fisiológicas o eritrócito humano apresenta um tempo de vida médio de cerca de 120 dias, que propicia o desenvolvimento dos processos oxidativos. Durante este período, o eritrócito desenvolve suas funções sem aparente dano peroxidativo (Chiu *et al.*, 1982) e isto deve-se a presença de um eficiente sistema antioxidante formado por enzimas e compostos antioxidantes.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

Estudar a interação dos surfactantes da série Tween (20, 40, e 80) com membranas de eritrócitos, visando esclarecer a natureza dessa interação;

Comparar os resultados do efeito hemolítico dos surfactantes da série Tween em relação a outro surfactante não-iônico (Triton X100), quanto a razão efetiva surfactante:lipídio, para a solubilização dos eritrócitos, de acordo com o tratamento clássico de Lichtenberg (1985) para agentes tensoativos;

Em função da detecção de oxidação da Hb nos ensaios hemolíticos: avaliar o efeito desses surfactantes na oxidação da hemoglobina, para maior compreensão dos mecanismos de ação desses compostos e da sua possível relação com o efeito hemolítico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Os surfactantes da série Tween (20, 40, e 80) foram obtidos da Sigma Chemical Co.

O eletrodo de K^+ (potássio) foi adquirido da Orion Research, Inc.

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

3.2 Métodos

3.2.1 Caracterização Óptica dos Surfactantes

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

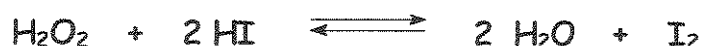
Nesta caracterização foram feitas varreduras do espectro de absorção no UV-visível (200-700 nm) de soluções conhecidas dos surfactantes (Tween 20, 40, 80 e Triton X100) em espectrofotômetro Beckman modelo DU70. As soluções foram preparadas em condições de pH e osmolaridade fisiológica (pH 7,4 e 154 mM NaCl).

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

3.2.2 Testes de Autoxidação dos Surfactantes

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

Em resumo: preparou-se uma solução 10% m/v de KI e adicionou-se uma alíquota (100 µl) do surfactante, na proporção 1:11 (KI : surfactante). As soluções de surfactantes (Tween 20, 40, 80 e Triton X100) foram preparadas, a partir de estoques mantidos no escuro e temperatura ambiente. As soluções obtidas foram agitadas e mantidas no escuro por 1 hora. A presença de peróxido foi determinada pelo aparecimento de coloração amarelada na solução, devido à oxidação do iodeto a iodo molecular (absorbância determinada em espectrofotômetro a 353 nm).



3.2.3 Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC) dos surfactantes através de medidas de Tensão Superficial

Para as medidas das tensões superficiais, utilizou-se um tensiômetro do tipo Kruss K12 (pertencente ao Laboratório de Propriedades Coloidais e Reológicas coordenado pelo Prof. Cesar Santana- FEQ/Unicamp) (Anexo I). As determinações foram feitas pelo método de Wilhelmy ou método da placa (Schick, 1987), onde uma pequena placa de mica é suspensa do braço de uma balança e mergulhada no líquido. Amostras de 20 ml dos surfactantes (Tween 20, 40, 80 e Triton X100), foram colocadas em cubeta de vidro de 4,5 cm de diâmetro e 2,3 cm de altura à temperatura desejada (25°C e 37°C). Para garantir o equilíbrio da solução, cada amostra permaneceu por 5 min. em repouso na cubeta, antes de cada medida. Testes preliminares mostraram que o tempo de repouso de 5 min. foi suficiente para obtenção de resultados reprodutíveis.

As amostras foram preparadas a partir de uma solução estoque do surfactante com concentração conhecida, da qual foram feitas diluições sucessivas até que a tensão superficial atingisse o valor de aproximadamente 72 mN/m, que é a tensão superficial da solução tampão. Para cada ponto de diluição o aparelho foi ajustado para fazer 10 medidas sucessivas de tensão superficial, fornecendo os valores juntamente com a sua

média aritmética. A CMC foi determinada graficamente pela intersecção das duas retas traçadas a partir da construção de curvas de tensão superficial média vs. concentração de surfactante. A descontinuidade no gráfico da propriedade medida em função da concentração do surfactante corresponde à CMC do mesmo. Mysels & 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 surfactante é não-linear. Os valores de CMC dependem das condições experimentais como temperatura e força iônica.

Nestes experimentos (feitos em duplicata), variamos a concentração de NaCl e a temperatura.

3.2.4 Medidas de Pureza e Composição Química por Ressonância Magnética Nuclear (^1H -RMN)

Essa técnica foi empregada para caracterizar a estrutura química das amostras dos surfactantes utilizados (Tween 20, 40, 80 e Triton X100), particularmente quanto a composição da porção hidrofóbica (cauda) dos mesmos.

A ressonância magnética nuclear (RMN) é fundamentada no fato de que os núcleos de muitos átomos têm associados a si um momento magnético e quando submetidos a um campo magnético externo, assumem uma orientação de acordo com o campo aplicado. Pela aplicação de um pulso oscilante na faixa de radiofrequência, pode-se excitar esses núcleos e detectar transições entre os níveis de energia (correspondentes a re-orientações dos spins nucleares), pela absorção da radiação. Essas mudanças de energia (absorção) são detectadas, digitalizadas e armazenadas por um espectrômetro de RMN. O resultado é um espectro, em que os picos de absorção correspondentes aos diferentes núcleos são decompostos e mostrados num gráfico de frequência (Hz) (Greff & Flangan, 1963; Derome, 1987).

O valor do campo magnético observado por um núcleo depende da estrutura eletrônica ao redor do mesmo; desta forma o núcleo analisado, por exemplo o hidrogênio (^1H) absorve energia em diferentes frequências quando em diferentes ambientes químicos. Em um dado composto, cada átomo de hidrogênio que estiver em um meio eletrônico diferente dos demais produzirá um pico no espectro de ressonância magnética nuclear. A frequência dos picos no espectro é comparada com a de um padrão externo como o TMS (Tetrametilsilano), ajustado em 0,0 ppm* (padrão). A diferença entre cada pico e o padrão TMS é definida como deslocamento químico (Derome, 1987).

Medidas quantitativas podem ser feitas comparativamente medindo-se a intensidade dos sinais ou área de cada pico. Esse fato permite o uso do RMN em aplicações quantitativas, sem necessitar o uso de padrões puros e curvas de calibração (Derome, 1987).

Os experimentos de ^1H -RMN foram conduzidos no espectrômetro Bruker DRX500, operando em um campo de 9,24 Tesla, pertencente ao Instituto de Química/USP.

Para esses ensaios, amostras de surfactantes (Tween 20, 40, 80 e Triton X100) foram preparadas em D_2O (água deuterada) no mesmo dia do ensaio. As concentrações dos surfactantes utilizadas foram de 50 mM. Para cada espectro obtido, os picos foram atribuídos aos grupamentos químicos e à quantidade de hidrogênios/pico calculada, permitindo quantificar as diferenças nas composições das cadeias acila dos Tween 20, 40 e 80.

* ppm = partes por milhão. Escala de espectro de RMN obtida pela razão entre a frequência do pico de ressonância e a frequência do espectrômetro de RMN, em Hertz (Derome, 1987).

3.2.5 Preparo da Suspensão de Eritrócitos

O sangue humano com anticoagulante (27 mM citrato sódico, 72 mM cloreto sódico, 114 mM glicose e 2.6 mM ácido cítrico) foi centrifugado por 5 min. a 700xg. O plasma, células brancas e gorduras, foram removidos por aspiração. As células vermelhas foram ressuspensas em PBS 5 mM (NaH_2PO_4 2mM, Na_2HPO_4 3 mM e NaCl 154 mM), pH 7,4, tampão de osmolaridade e pH fisiológico, sendo novamente centrifugadas nas mesmas condições. Após três repetições consecutivas desse processo obteve-se o concentrado de hemáceas que foi mantido sob refrigeração (4 °C). Esta "papa" de hemáceas, com concentração de 100% (Ht100%) foi diluída para hematócritos diferentes com o mesmo tampão, de acordo com o objetivo do experimento (entre 5 e 20%).

3.2.6 Testes Hemolíticos

3.2.6.1 Em Meio Isotônico, medidos pela Liberação de Hemoglobina

A determinação da resistência à hemólise foi acompanhada pela incubação das suspensões de eritrócitos em solução isotônica (PBS) com diferentes concentrações dos surfactantes (Tween 20, 40, 80 e Triton X100). Após incubação de 15 min. a 37°C as amostras foram centrifugadas por 5 min. a 1500xg e a concentração de hemoglobina no sobrenadante foi determinada espectrofotometricamente a 540 nm. Nesse comprimento de onda o coeficiente de extinção molar da oxi-Hb é de 55.200 (Riggs, 1981). Foram realizadas medidas em triplicatas para cada concentração de surfactante e também para os seguintes controles: C_1 = eritrócitos em PBS (controle de hemólise mecânica) e C_2 = eritrócitos em água destilada (controle de hemólise total).

O efeito hemolítico (% de Hemólise) pôde ser acompanhado medindo-se a concentração de hemoglobina no sobrenadante de acordo com a fórmula:

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

onde A_a , A_{c1} e A_{c2} são respectivamente as absorbâncias da amostra, dos controles C_1 e C_2 em 540 nm.

Estes experimentos foram realizados em triplicata com diferentes Ht (5, 10, 15 e 20%) com o objetivo de determinar as concentrações para início (C^{sat}) e hemólise total (C^{sol}).

3.2.6.2 Em Meio Isotônico, pela medida de Liberação de Potássio (K^+) Intracelular

A saída de potássio (K^+) foi medida potenciometricamente através de um eletrodo específico para esse íon, conforme descrito por Katsu *et al.* (1989). O ensaio foi realizado como descrito anteriormente (item 3.2.6.1). Medidas potenciométricas da concentração de potássio foram realizadas em triplicata para cada concentração de surfactantes nas alíquotas dos sobrenadante e para os controles C_1 e C_2 , como descrito anteriormente.

A partir de soluções de KCl (entre 10^{-5} e 10^{-3} M) e medidas potenciométricas (mV) construímos uma curva-padrão para determinar a concentração de K^+ liberado nos ensaios hemolíticos.

O eletrodo mostrou-se sensível na faixa de 0 a 100 μ M de K^+ . Desta forma, fizemos diluições apropriadas nos sobrenadantes dos ensaios hemolíticos a fim de detectar a $[K^+]$ liberada no meio extracelular, dentro da faixa de sensibilidade do eletrodo.

O efeito hemolítico em condições isotônicas foi expresso em % de hemólise, como descrito na equação 3.

3.2.6.3 Testes Hemolíticos em Meio Hipotônico (Proteção)

A determinação da proteção à hemólise foi acompanhada pela liberação da hemoglobina, após a incubação das suspensões de eritrócitos em solução hipotônica com diferentes concentrações dos surfactantes (Tween 20, 40, 80 e Triton X100),

durante 15 min. a 37°C. A solução hipotônica foi preparada diluindo-se PBS em H₂O (aproximadamente 1:1, v:v) tal que a concentração final de NaCl (~77 mM) causasse uma lise igual a 50% da total (Abs C₁= 1/2 Abs C₂). Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 1500xg por 5 min. e a concentração de hemoglobina no sobrenadante foi determinada espectrofotometricamente a 415 nm pela liberação da Hb. Nesse comprimento de onda a absorvidade molar da oxi-Hb é de 500.000 (Antonini & Brunori, 1975). Foram realizadas várias medidas (em triplicata) para cada concentração de surfactante e para os controles: C₁= eritrócitos em PBS:água (controle de 50% de hemólise), C₂= eritrócitos em água destilada (controle de hemólise total) e C₃= eritrócitos em PBS (controle da estabilidade dos eritrócitos).

O cálculo para determinação da hemólise relativa (H.R.) foi feito de acordo com a equação 4.

$$H.R. = \frac{A_{amostra}}{A_{C1}} \quad (4)$$

Onde A_{amostra} e A_{C1} são as absorbâncias da amostra e do controle 1 (PBS:água). Valores de H. R. menores que 1 indicam proteção e H. R. maiores que 1 evidenciam hemólise.

3.2.6.4 Considerações Experimentais sobre os Ensaio Hemolíticos

Muitas dificuldades experimentais foram encontradas i) na determinação da concentração salina adequada à fragilização das hemácias (item 3.2.6.3), ii) na escolha do tipo e concentração de hemácias para os ensaios hemolíticos e iii) na adequação da metodologia experimental, já que a liberação de Hb não é sempre adequada como parâmetro de hemólise pois em altas concentrações de Tween 80, a Hb se oxida e sua absorção óptica é afetada (como descrito no item 3.2.8).

Em relação à concentração de hemáceas nos ensaios hemolíticos, é preciso esclarecer que a tentativa de explicar (e correlacionar) resultados de RPE obtidos anteriormente em nosso laboratório (Ramos, 1991) sobre o efeito do Tween 80 em eritrócitos, levou-nos a usar hematócritos muito altos (entre 5 a 20%), pois só nessa alta concentração de hemácias foi possível incorporar marcadores de spin em concentração suficiente para registro dos espectros de RPE. Com isso tivemos que optar pelo uso de sangue humano pois os volumes usados nos ensaios exigiriam o sacrifício de um grande número de ratos/experimento.

Note-se que ensaios hemolíticos podem ser feitos com Ht de 0,15%, medindo-se diretamente a concentração de Hb ou K^+ liberados, sem necessidade de diluição. No caso da medida espectrofotométrica de Hb, o pico da banda do Soret (415 nm) é o mais adequado para o trabalho em soluções de hematócritos tão baixos, pois o coeficiente de absortividade molar da Hb nesse comprimento de onda é quase 10 vezes maior que em 540 nm. Em nossas condições experimentais tivemos a opção de determinar a concentração de Hb em ambos os comprimentos de onda, e sempre após diluição apropriada do sobrenadante.

3.2.7 Purificação e Determinação da Concentração da Hemoglobina em Solução

No preparo de hemoglobina purificada, as suspensões de hemácias foram lavadas 3 vezes em solução salina (154 mM de NaCl e centrifugadas a 700xg, durante 5 minutos), hemolisadas com água destilada (1:1, v:v) e centrifugadas (1500xg, 5 min), descartando-se o precipitado. O "hemolisado total" assim obtido foi submetido à uma cromatografia de coluna, de filtração molecular (Sephadex G-25), contra tampão Bis-Tris 0,02M, pH 8,0. Nesse procedimento a Hb é separada de outras proteínas e de compostos de baixa massa molecular, pois fosfatos orgânicos como o 2,3 bifosfoglicerato ficam retidos no gel (Berman *et al.*, 1977). Em seguida, a solução de

Hb foi dialisada "overnight" contra tampão Bis-Tris 0,02 M, pH 7,4 para reequilibrar o pH fisiológico.

A concentração das soluções de hemoglobina foi determinada espectrofotometricamente, pela absorção em 415 nm.

3.2.8 Oxidação da Hemoglobina

A oxi-Hb bem como a meta-Hb têm espectros ópticos característicos que podem ser usados para sua determinação quantitativa. Neste experimento, concentrações fixas de Hb purificada, foram incubadas com concentrações crescentes de surfactantes (Tween 20, 40, 80 e Triton X100) nas mesmas condições dos ensaios hemolíticos, utilizando como controle Hb tratada com concentrações crescentes de $K_3Fe(CN)_6$. A quantificação da oxi-Hb foi feita pela absorção em 541 e 577 nm e da meta-Hb em 630 nm. (Winterbourn, 1990).

$$\text{Oxi-Hb} = 66.A_{577} - 80.A_{630} \quad (5)$$

$$\text{Met-Hb} = 279.A_{630} - 3.0.A_{577}$$

4 RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1 Caracterização dos Surfactantes

4.1.1 Análise Espectral dos Surfactantes (200-700nm)

Nenhum dos surfactantes utilizados (Tween 20, 40, 80 e Triton X100) apresentaram absorção de luz na faixa de onda do UV-visível (200-700 nm). Assim, podemos concluir que os mesmos não interferiram na análise dos espectros da Hb (estudos de hemólise e oxidação), visto que a mesma possui três picos bem definidos na região do visível, acima de 400 nm.

4.1.2 Testes de Autoxidação nos Estoques de Surfactantes

A concentração de hidroperóxido medida por Iodometria fornece um índice do processo de autoxidação dos surfactantes que poderia ocorrer por ação da luz, pH e temperatura de acordo com Donbrow e col. (1978).

Segundo a metodologia utilizada (item 3.2.2), nenhuma das amostras estudadas sofreu autoxidação nas condições de estocagem (temperatura ambiente e ausência de luz) durante o tempo de realização dos experimentos, já que em todos os experimentos realizados o valor de absorbância medido foi inferior a 0,01. Caso as amostras tivessem sofrido oxidação a formação de peróxido nas mesmas seria inferior a 0,005g/litro, e não seria suficiente para interferir nos experimentos hemolíticos.

4.1.3 Determinação da CMC por Tensão Superficial

O objetivo de se determinar a CMC dos surfactantes foi avaliar se as condições experimentais de ensaio hemolítico (temperatura e concentração de NaCl), causariam uma variação significativa no valor dessa propriedade dos surfactantes usados, em relação aos valores de literatura obtidos a 25°C (Helenius *et al.*, 1979).

A figura 8 mostra as curvas de tensão superficial usadas para a determinação da CMC do Tween 80, em diferentes temperaturas (25 e 37°C) e concentrações iônicas (0 e 154 mM de NaCl). O método utilizado (item 3.2.3) foi o de placas de Wilhelmy, onde uma pequena placa é suspensa do braço de uma balança e mergulhada na solução, medindo-se a tensão superficial pela força contrária ao levantamento da placa (Anexo 1).

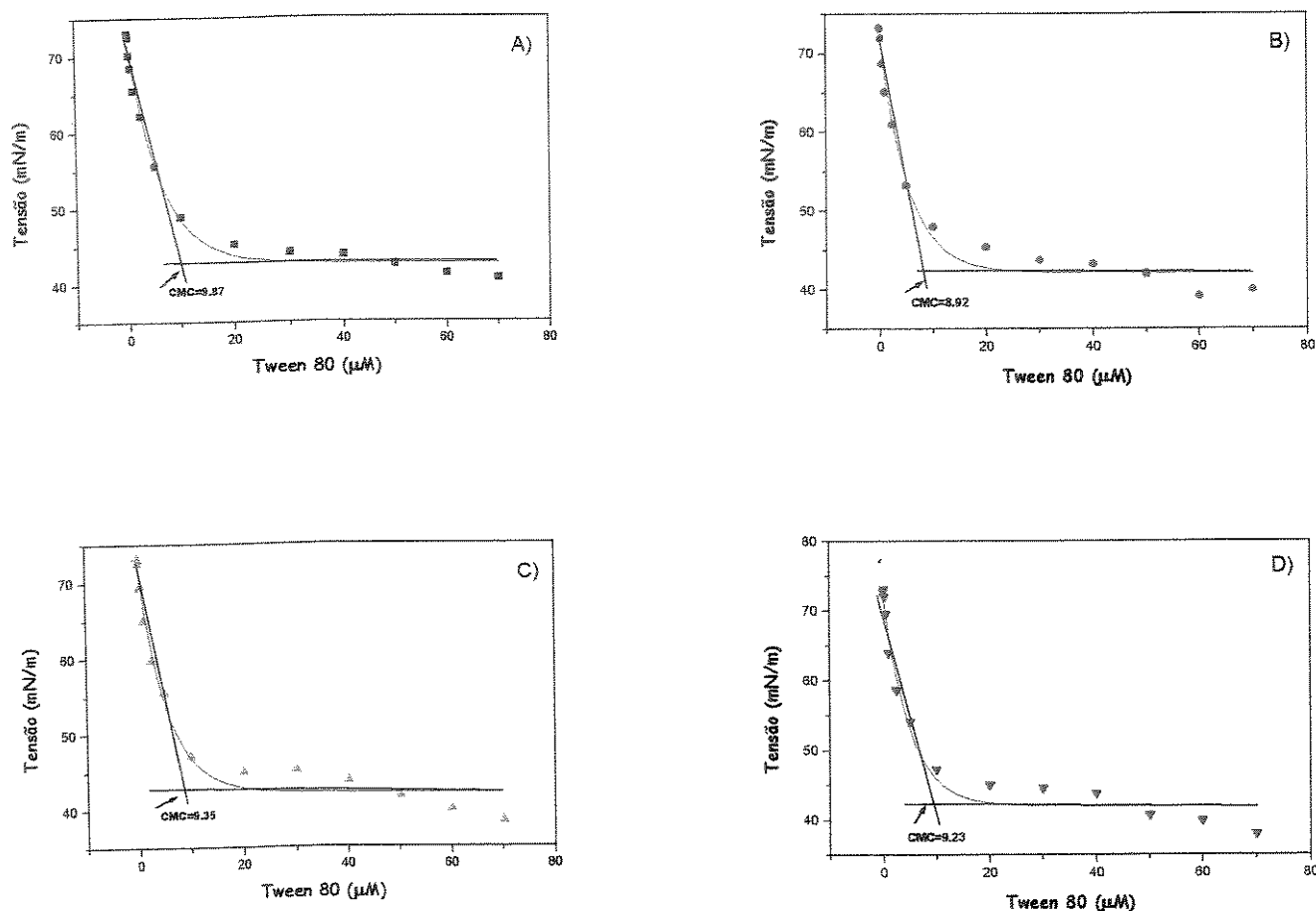


Figura 8 - Curvas de Tensão Superficial do surfactante Tween 80 e determinação da CMC em diferentes temperaturas e concentrações iônicas (A) NaCl 154 mM, 25°C, (B) NaCl 154 mM, 37°C, (C) H₂O, 25°C, (D) H₂O, 37°C.

Comparando-se as curvas de tensão superficial nas diferentes condições (Figura 8), não observamos variação significativa nos valores de CMC, indicando que a temperatura e a quantidade de íons não influenciaram nas medidas.

Os resultados obtidos através das medidas e a similaridade com os dados de literatura (Helenius *et al.*, 1979), mostrados na tabela II, indicam que o método utilizado na determinação da CMC foi bastante preciso.

Kanungo *et al.*, (1984), observou que a CMC do CTAB, um surfactante catiônico, aumenta gradualmente com a adição de glicose e sacarose. Acharya e col. (1999), estudando o efeito de carboidratos (glicose, sacarose, maltose e galactose) na micelização de vários compostos observaram que as CMCs dos surfactantes não-iônicos Tween 20, 40, 60, 80 e Triton X100 diminuem na presença desses açúcares porém a diminuição é menor que a observada com detergentes iônicos.

Na presença de carboidratos a interação água-água é substituída por água-açúcar e, como consequência dessa substituição, é favorecida a formação de micelas (Acharya *et al.*, 1999).

A tabela II mostra os valores de CMC obtidos nas diferentes condições. (valores médios de dois experimentos) com os demais surfactantes da série.

Tabela II - Valores de CMC, medidos por Tensão Superficial. Dados referentes aos gráficos da Figura 8.

Surfactante	Condição	25°C	37°C	Literatura
Tween 20	H ₂ O	57,89 µM	58,21 µM	59 µM
	NaCl (154 mM)	56,73 µM	59,54 µM	----
Tween 40	H ₂ O	28,53 µM	26,92 µM	27 µM
	NaCl (154 mM)	25,51 µM	27,86 µM	----
Tween 80	H ₂ O	9,35 µM	9,23 µM	12 µM
	NaCl (154 mM)	9,87 µM	8,92 µM	----
Triton X-100	H ₂ O	0,25 mM	0,27 mM	0,25 mM
	NaCl (154 mM)	0,27 mM	0,24 mM	----

Apesar de mostrarmos graficamente somente as medidas com o Tween 80, os valores de CMC obtidos para os demais surfactantes (Tween 20, 40 e Triton X100) estão de acordo com os de literatura (tabela I), indicando que a variação de NaCl e temperatura não influenciaram na mudança dessa propriedade (CMC) dos surfactantes (Helenius *et al.*, 1979).

4.1.4 Ressonância Magnética Nuclear

As figuras 9, 10, 11 e 12 mostram medidas de ^1H -RMN de hidrogênios, que possibilitaram confirmar o tamanho da cadeia hidrocarbônica (cauda) dos surfactantes utilizados (Tween 20, 40, 80 e Triton X100).

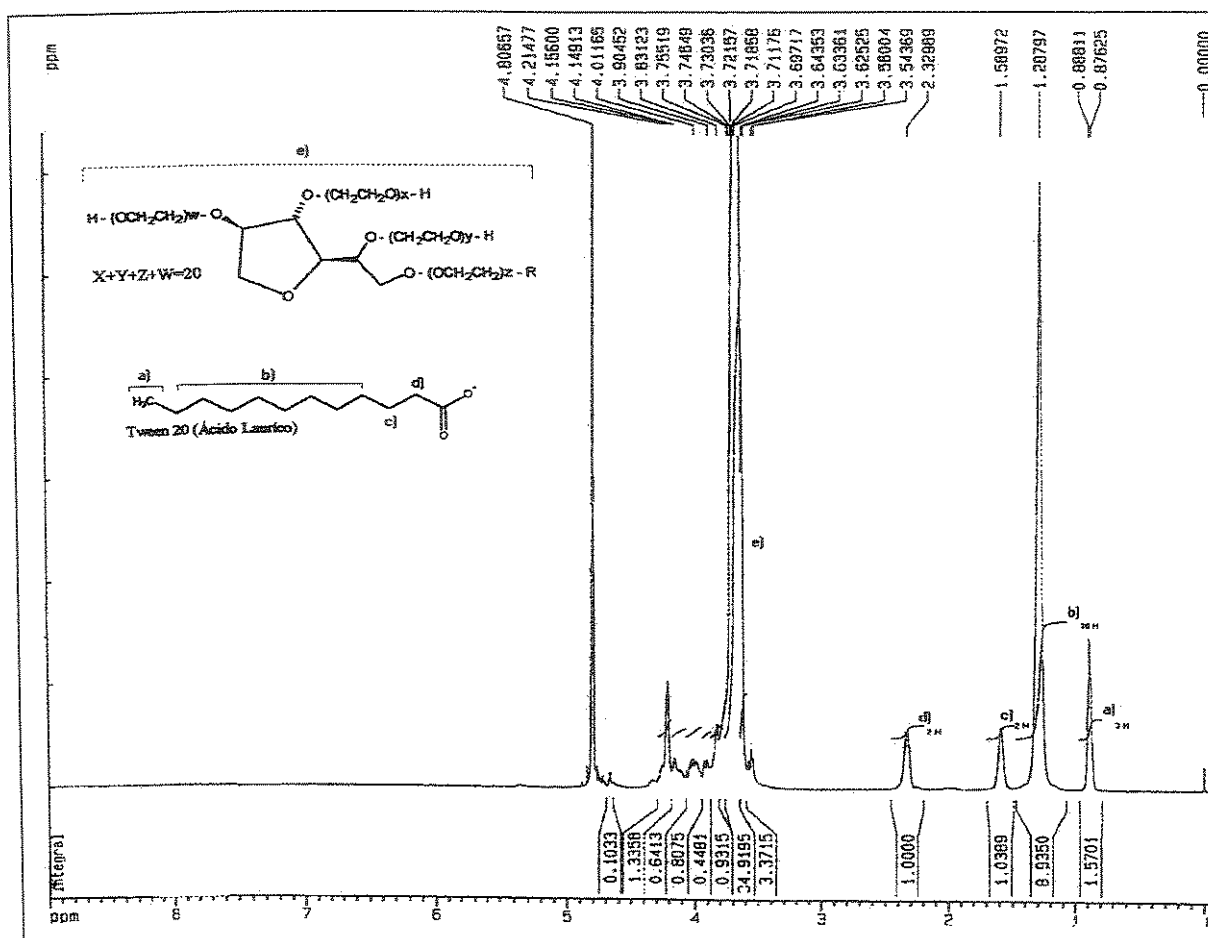


Figura 9 - Espectro de ^1H -RMN (500 MHz) do surfactante Tween 20 em D_2O , com as devidas atribuições dos picos da molécula.

Para cada um dos espectros obtidos, foi feita a integração da área dos picos, que permitiu saber o número de ^1H /pico.

A análise de ^1H -RMN dos surfactantes da série Tween objetivou comprovar o tamanho da cauda acila, já que os mesmos possuem 4 cadeias polares de $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})\text{H}$ cujos picos na região de 3,7 a 4,2 ppm não são distinguíveis, mesmo em alta resolução (500 MHz).

A figura 9 mostra que a área do pico a (correspondente a metila terminal da porção hidrofóbica do Tween 20), corresponde a absorção de 3 ^1H e, portanto a área do pico b corresponde a 16 ^1H e as dos picos c e d a 2 ^1H , tal que o Tween 20 tem cauda composta de 12 carbonos, correspondentes aos ^1H dos picos a, b, c, d, além da carbonila (COO^-). A integração dos picos revela que o ácido láurico é a cadeia acila do surfactante e também indica a pureza do mesmo.

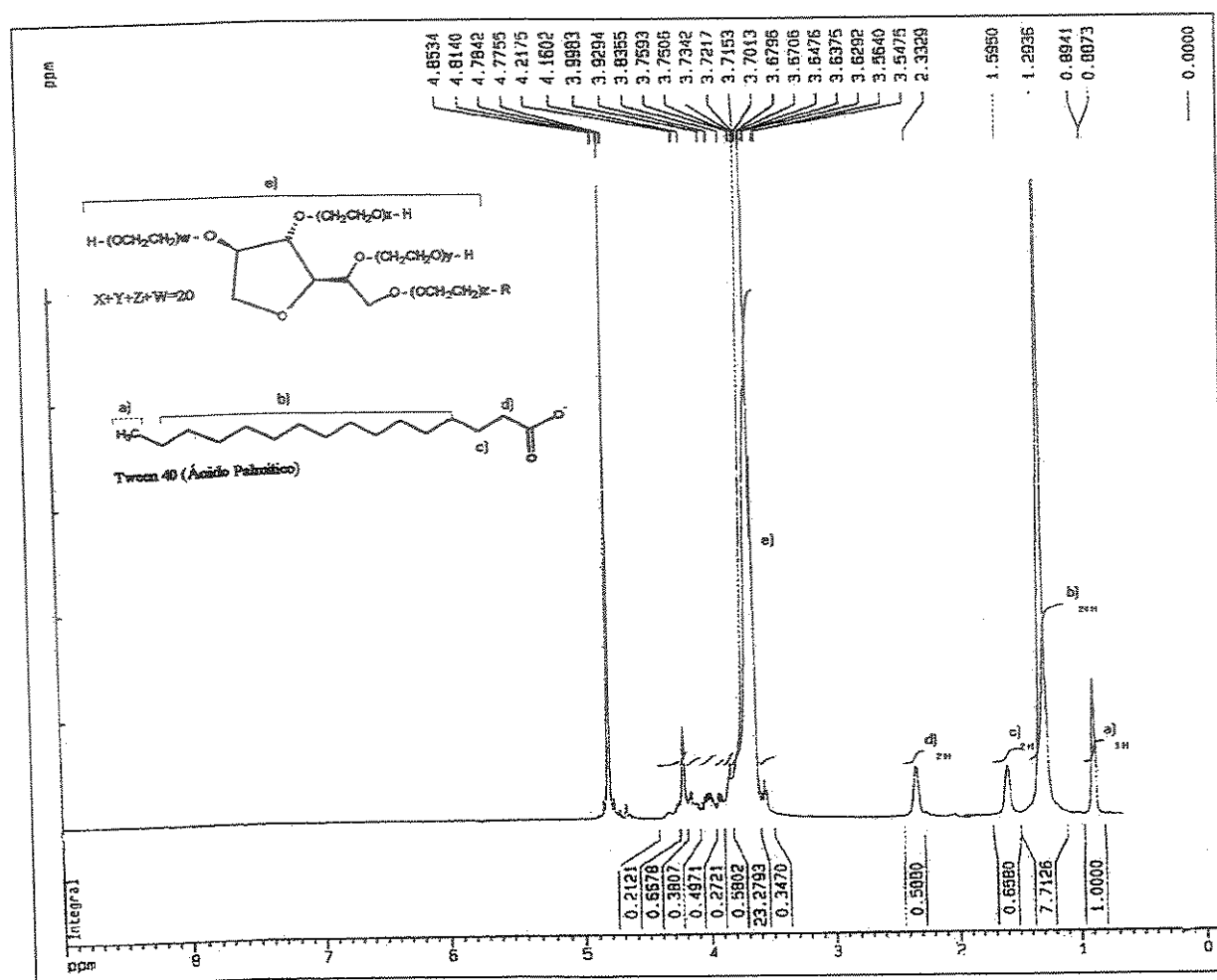


Figura 10 - Espectro de ^1H -RMN (500 MHz) do surfactante Tween 40 em D_2O , com as devidas atribuições dos picos da molécula.

A figura 10 mostra que o Tween 40 tem cauda composta de 16 carbonos, correspondentes aos ^1H dos picos a, b, c, d, além da carbonila (COO^-).

A análise da integração dos picos da cauda da figura indica pureza do Tween 40 e que o ácido palmítico é a cadeia acila do mesmo.

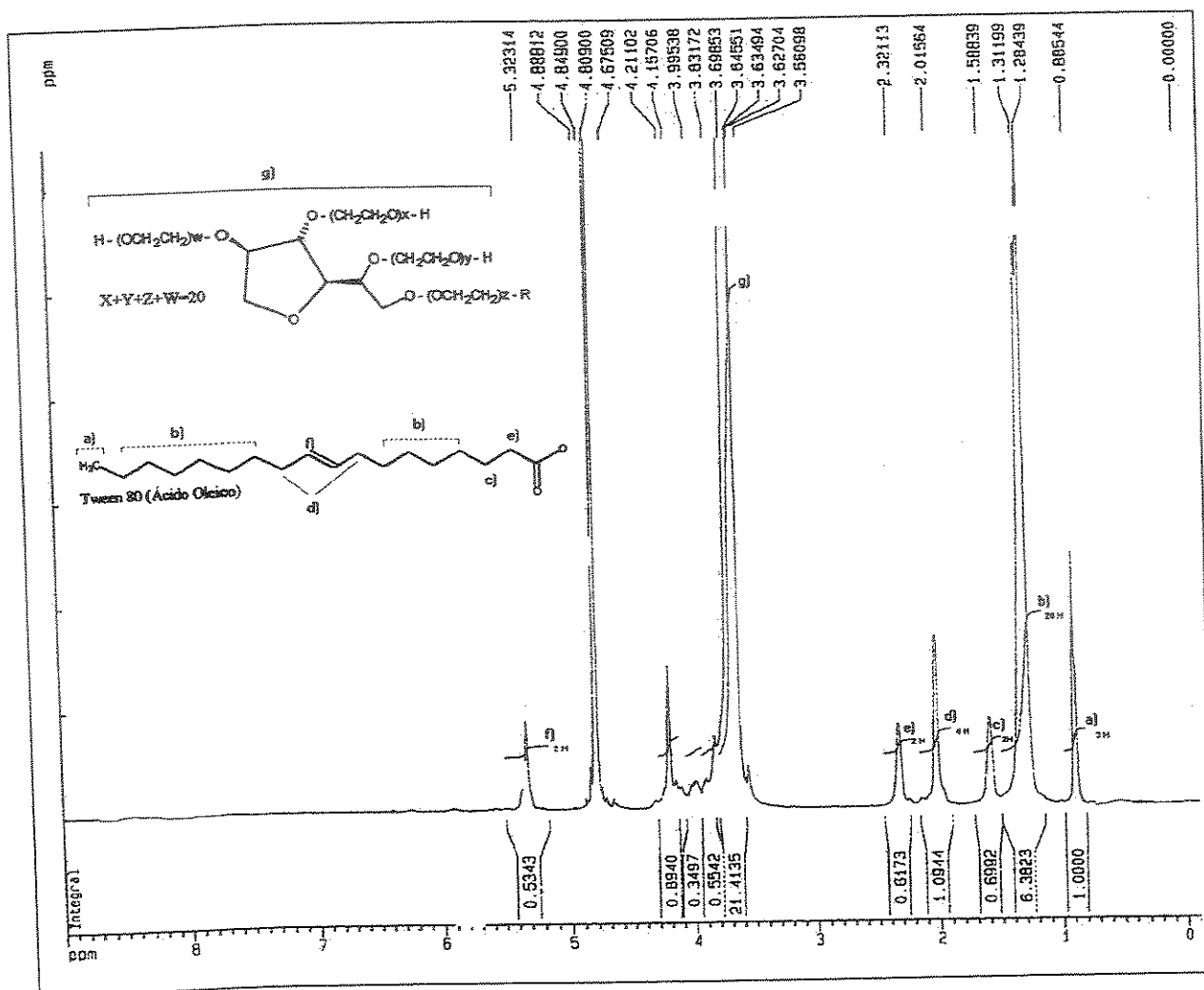


Figura 11 - Espectro de ^1H -RMN (500 MHz) do surfactante Tween 80 em D_2O , com as devidas atribuições dos picos da molécula.

A análise da integração dos picos da cauda da figura 11 (Tween 80) indica que o surfactante possui 18 carbonos ($a + b + c + d + e + f$), com uma insaturação (pico f) e que o ácido oléico constitui a cadeia acila do Tween 80.

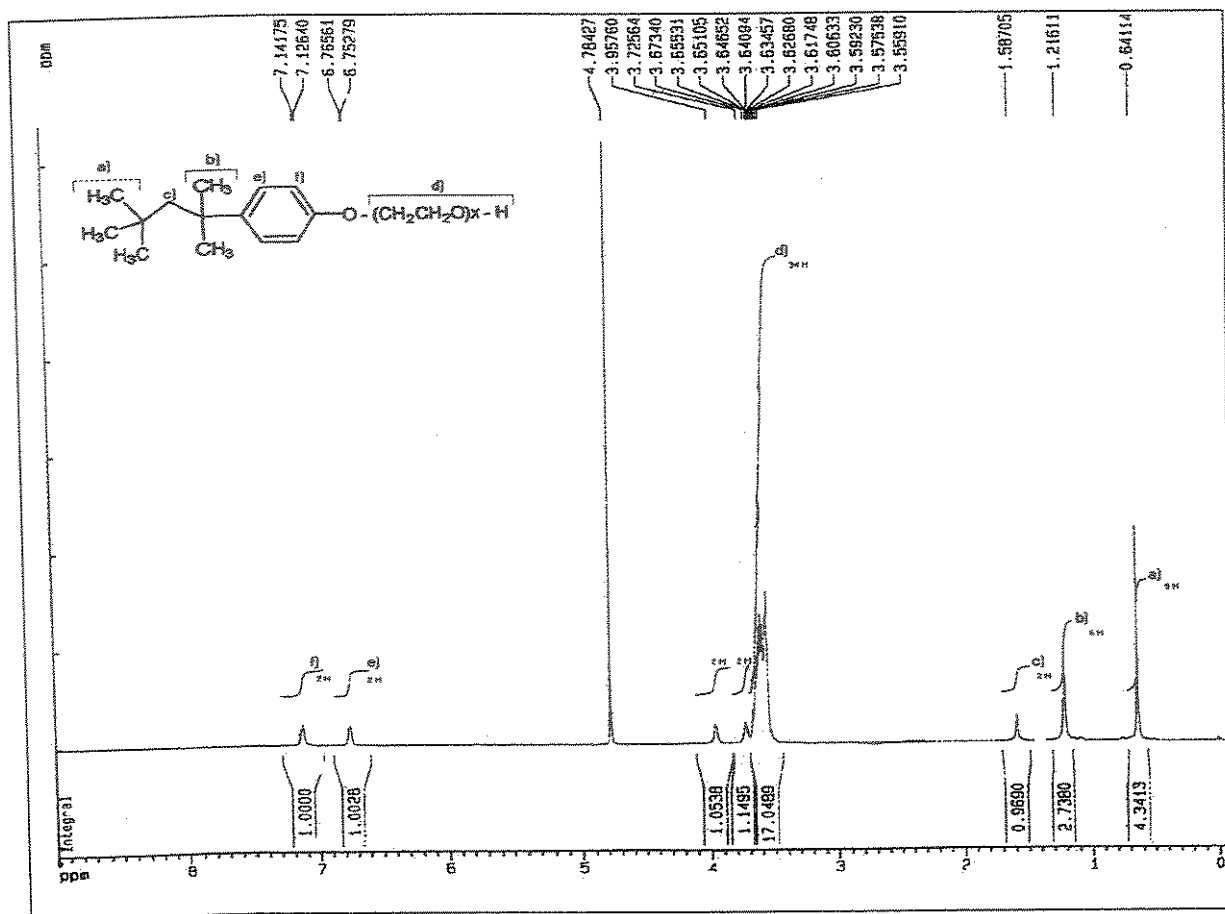


Figura 12 - Espectro de ^1H -RMN (500 MHz) do surfactante Triton X100 em D_2O , com as devidas atribuições dos picos da molécula.

A atribuição de picos da figura 12, confere com a estrutura do surfactante (Triton X-100). Neste caso foi possível atribuir todos os picos e há, de fato (9 a 10) resíduos de polioxietileno na cabeça polar do Triton X100 (pico d + 2 laterais = $34 + 2 + 2$ hidrogênios ; $38/4 = 9,5$ resíduos de $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$).

Para todos os surfactantes utilizados o número de ^1H (RMN) esperado está de acordo com a estrutura química de cada composto, visto que levamos em consideração e avaliamos somente a cauda (porção hidrofóbica) dos mesmos.

4.2 Interações dos Surfactantes com Membranas Biológicas

4.2.1 Teste de Integridade Celular

A figura 13 mostra o grau de integridade dos eritrócitos com a passar dos dias. Esse teste foi feito para padronização dos ensaios hemolíticos. Procuramos determinar a viabilidade das células, visto que toda a parte experimental foi feita com material obtido de bolsas de sangue fornecidas pelo Hemocentro da Unicamp. Os ensaios foram feitos nas mesmas condições dos testes hemolíticos (descritas no item 3.2.6.1) e o hematócrito (Ht) utilizado nesses ensaios foi de 5%.

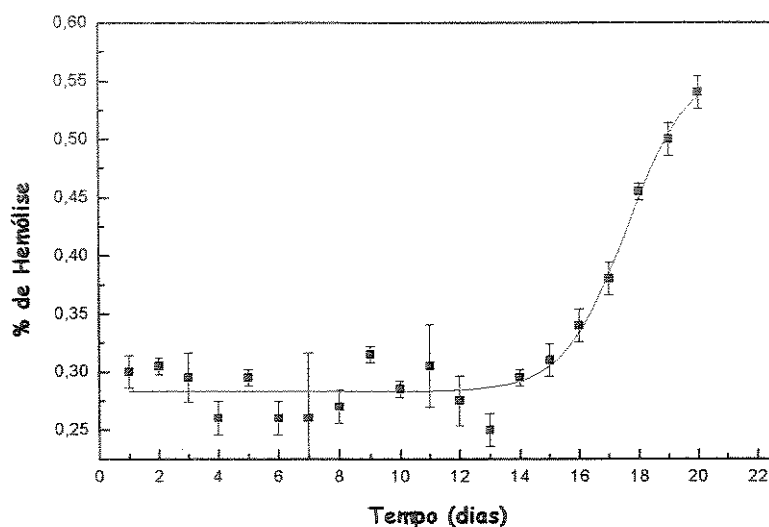


Figura 13 - Teste de integridade celular de eritrócitos em condição isotônica (tampão PBS 5 mM, pH 7,4), incubados a 37°C por 15 min. em função do tempo (dias) de estocagem.

Através desse teste padronizamos por quanto tempo poderíamos utilizar os eritrócitos, estocados a 5°C em bolsas comerciais, isto é, em condições assépticas e contendo nutrientes para a sobrevivência das células. Vê-se que a hemólise mecânica começa a aumentar significativamente a partir do 16º dia. Apesar da porcentagem de hemólise ainda ser pequena (cerca 0,35%), padronizamos como tempo máximo de utilização das bolsas 10 dias à partir da coleta.

4.2.2 Teste de Resistência a Hemólise

A figura 14, mostra a curva de resistência hemolítica de eritrócitos em solução de NaCl nas concentrações molares de 0 (em H₂O) até 154 mM (correspondente à concentração fisiológica 0,9%). A partir desta curva escolhemos a concentração de NaCl que causava 50% de hemólise. O Ht utilizado foi de 5%.

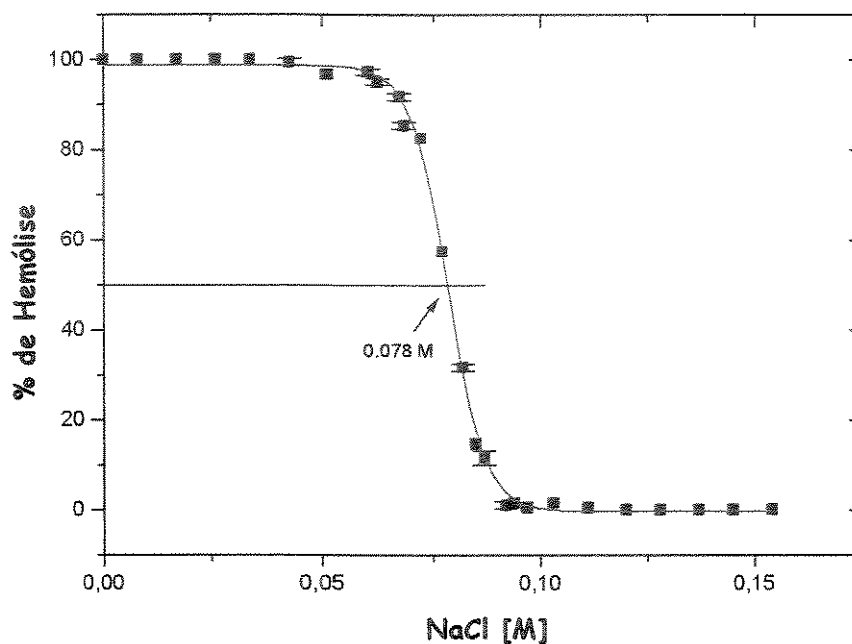


Figura 14 - Efeito hemolítico em gradiente de NaCl (0-154 mM) em eritrócitos humanos (Ht 5%), incubados a 37°C por 15 minutos.

A concentração de NaCl que causa 50% de hemólise é de aproximadamente 78 mM. A % de hemólise é calculada a partir da quantidade de hemoglobina liberada da célula em relação àquela liberada quando as hemácias são ressuspensas em água, de acordo com a equação 3 (item 3.2.6.1).

4.2.3 Testes Hemolíticos em Condições Isotônicas (liberação de Hb)

As figuras 15, 16, 17 e 18, mostram o efeito dos surfactantes (Tween 20, 40, 80 e Triton X100, respectivamente) em eritrócitos, em condições de osmolaridade e pH fisiológicos (PBS e pH 7,4). Nestes ensaios variamos ainda a concentração de eritrócitos (Ht-5, 10, 15 e 20%) e detectamos a concentração de surfactante para início (C^{sat}) e 100% de hemólise (C^{sol}).

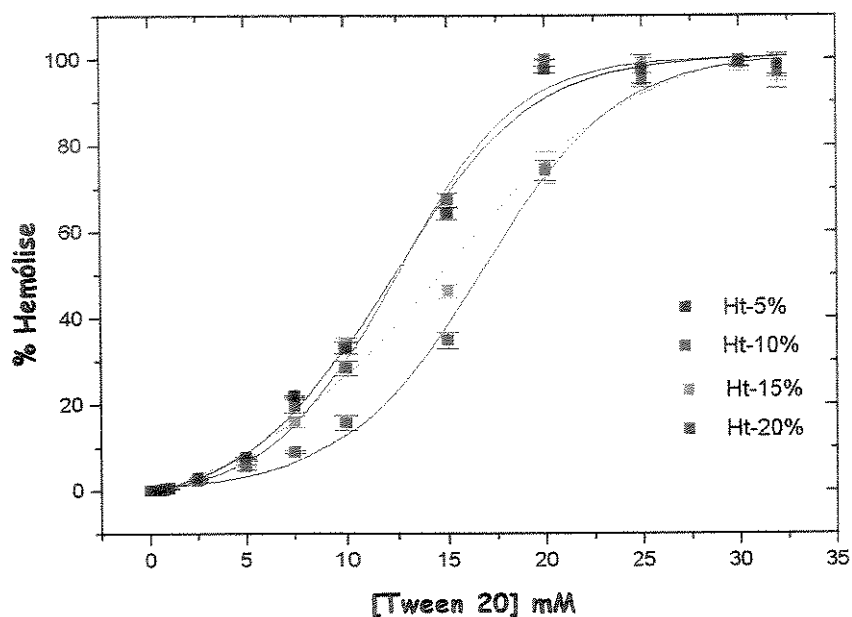


Figura 15 - Efeito da concentração de Tween 20 sobre eritrócitos íntegros (Ht 5, 10, 15 e 20%), incubados em solução isotônica (PBS, pH 7,4) a 37°C.

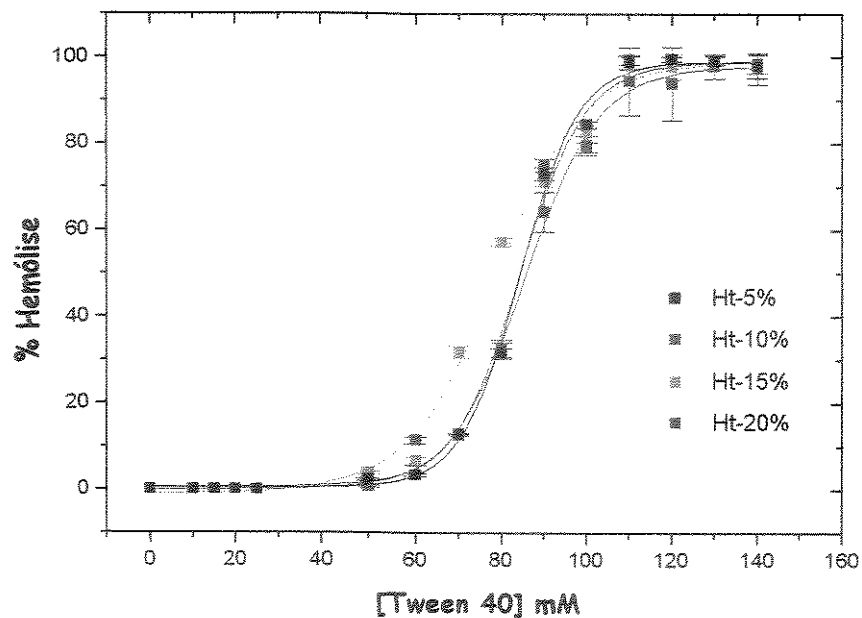


Figura 16 - Efeito da concentração de Tween 40 sobre eritrócitos íntegros (Ht 5, 10, 15 e 20%), incubados em solução isotônica (PBS, pH 7,4) a 37°C.

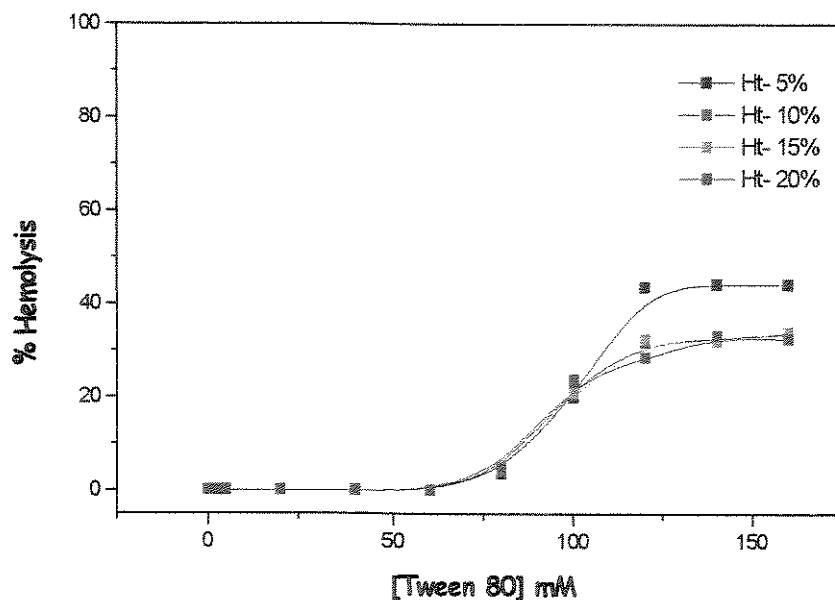


Figura 17 - Efeito da concentração de Tween 80 sobre eritrócitos íntegros (Ht 5, 10, 15 e 20%), incubados em solução isotônica (PBS, pH 7,4) a 37°C.

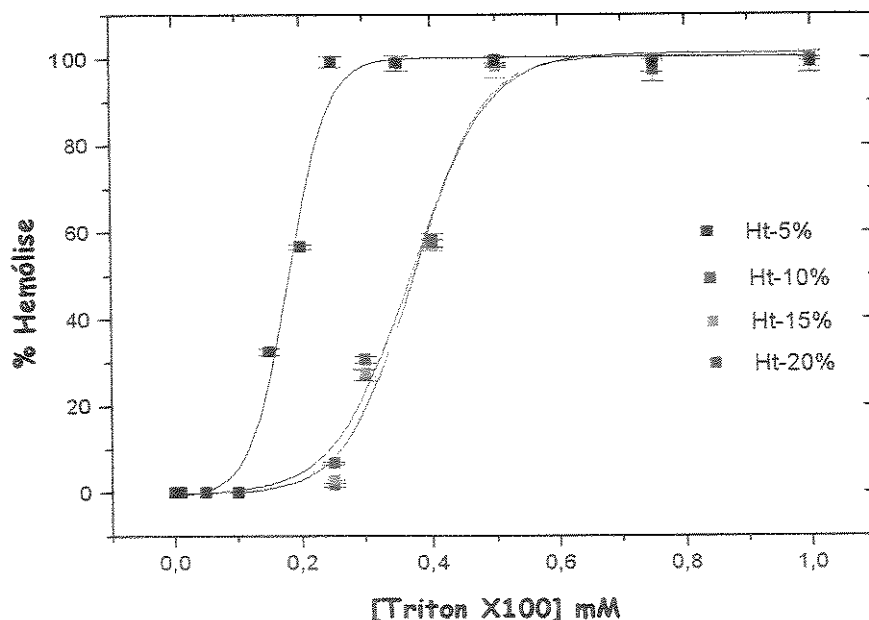


Figura 18 - Efeito da concentração de Triton X100 sobre eritrócitos íntegros (Ht 5, 10, 15 e 20%), incubados em solução isotônica (PBS, pH 7,4) a 37°C.

Na análise do perfil hemolítico das figuras 15, 16, 17 e 18, observamos que para todos os surfactantes estudados o efeito hemolítico em condições isotônicas apresentou um comportamento sigmoidal característico. Em baixas concentrações, observou-se que a membrana eritrocitária é capaz de absorver uma certa quantidade de surfactantes sem que a lise ocorra, que corresponde ao primeiro platô da curva. A partir de determinada concentração (C^{sat}) a membrana se satura e a lise começa ocorrer. O segundo platô (C^{sol}) acontece quando a membrana está completamente desestruturada, ou seja, quando ocorre a lise total. Ao considerarmos C^{sat} e C^{sol} como a concentração para início e 100% de hemólise, respectivamente, estamos nos apropriando do tratamento de Lichtenberg (1985) para surfactantes. Nesse caso, a Hb como molécula "marcadora" seria liberada em solução como sinal de saturação da membrana, seguida da sua ruptura. No entanto é preciso ser cauteloso com esse uso pois há controvérsias na literatura sobre a relação entre liberação de Hb (que necessita da abertura de grandes poros na membrana) e a solubilização da membrana.

Além disso a Hb, como molécula marcadora pode ser afetada de alguma maneira durante o processo hemolítico, perdendo ou alterando suas propriedades ópticas até tornar-se inadequada à medida de lise eritrocitária, como discutiremos a seguir, para o Tween 80.

Observamos que a concentração para saturação da membrana é menor para o Triton X100 que para os demais (Tween 20, 40 e 80), revelando ser o Triton X100 um bom agente hemolítico, como mostra também a literatura (Goni *et al.*, 1986; Bielawski *et al.*, 1995).

Dentro da série Tween a potência lítica é maior para o Tween 20 > 40 > 80, o que também está de acordo com trabalhos de literatura, que mostram o uso do Tween 20 como solubilizante de membrana, e não de seus análogos, mais hidrofóbicos (40, 60 e 80) (Wong *et al.*, 1987; Nampoothiri & Pandey, 1998; Cho *et al.*, 2000).

Os valores de C^{sol} teriam o mesmo perfil detectado para a saturação não fosse um fenômeno adicional registrado na figura 17, em que o Tween 80 não parece ser capaz de induzir hemólise total. Para interpretar esse fenômeno procuramos na literatura especializada trabalhos sobre o efeito de outros surfactantes não-iônicos na lise de membranas e vimos que há vários surfactantes que não são bons agentes hemolíticos, como os da série Renex (Galembeck *et al.*, 1998), cujos compostos mais hidrofílicos (C_9E_{20} e C_9E_{100}) não induzem hemólise alguma.

Esse caso era bem diferente do efeito do Tween 80, que chega a causar aproximadamente 40% de hemólise (figura 17). Na verdade observamos que em altas concentrações do Tween 80 a Hb liberada tinha coloração diferente (mais escura) e, nas concentrações acima de 100 mM de surfactante havia co-sedimentação da Hb, indicando desnaturação protéica. O Tween 80 causa oxidação da Hb (em concentrações extremamente altas) como discutiremos no item 4.3. Dessa forma não pudemos fazer para o Tween 80 análise quantitativa da concentração de surfactante para 100% de hemólise (C^{sol}).

A tabela III mostra os valores de C^{sat} e C^{sol} , retirados das curvas hemolíticas. Os valores de R refletem a razão molar total surfactante:lipídio, para saturação (R^{sat}) e solubilização (R^{sol}) da membrana, respectivamente. Esses valores puderam ser calculados porque determinamos C^{sat} e C^{sol} das curvas hemolíticas e conhecíamos a concentração lipídica correspondente a cada Ht utilizado (Malheiros *et al.*, 1998).

Os valores de C^{sat} mostram que em condições isotônicas, o Triton X100 tem efeito lítico na faixa de sua CMC (ver tabela I), enquanto que para os demais surfactantes (Tween 20, 40 e 80) esse efeito ocorre acima de suas respectivas CMCs (tabela I). Nossos resultados estão de acordo com os valores de literatura (Bielawski *et al.*, 1995) e mostram que o Tween 20 é o mais lítico da série, seguido pelo Tween 40 e Tween 80. Já o Triton X100 tem efeito lítico muito mais evidente, justificando sua ampla utilização como agente de solubilização de membranas.

Tabela III - Parâmetros Quantitativos do Efeito Hemolítico dos Surfactantes, Medidos por Liberação de Hb. Condições Experimentais como nas Figura 15 a 18.

Surfactante	C^{sat} (mM)				R^{sat}			
	Ht-5% 0,44 mM Lip	Ht-10% 0,87 mM Lip	Ht-15% 1,30 mM Lip	Ht-20% 1,74 mM Lip	Ht-5% 0,44 mM Lip	Ht-10% 0,87 mM Lip	Ht-15% 1,30 mM Lip	Ht-20% 1,74 mM Lip
Tween 20	5,50	9,00	3,90	5,97	12,60	10,34	3,00	3,43
Tween 40	70,50	69,30	56,82	67,77	162,07	79,65	43,54	38,95
Tween 80	77,43	74,64	73,44	72,92	178,00	85,79	56,28	41,91
Triton X100	0,11	0,24	0,26	0,26	0,25	0,27	0,20	0,15

Surfactante	C^{sol} (mM)				R^{sol}			
	Ht-5% 0,44 mM Lip	Ht-10% 0,87 mM Lip	Ht-15% 1,30 mM Lip	Ht-20% 1,74 mM Lip	Ht-5% 0,44 mM Lip	Ht-10% 0,87 mM Lip	Ht-15% 1,30 mM Lip	Ht-20% 1,74 mM Lip
Tween 20	19,60	24,27	25,10	18,90	45,06	27,90	19,23	10,86
Tween 40	99,20	100,70	101,17	103,47	228,05	115,75	77,52	59,47
Tween 80	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Triton X100	0,25	0,49	0,49	0,49	0,57	0,56	0,37	0,28

nd = não determinado devido a oxidação da Hb

Outro fato curioso dentro da série Tween é que os homólogos mais hidrofóbicos são os menos potentes para a lise, enquanto esperava-se o contrário, já que a lise depende da concentração de surfactante que particiona na membrana. É o caso de comparar o efeito do Triton X100 (mais hidrofóbico) com os Tweens (de maior HLB).

Encontramos uma grande dispersão de dados. No caso do Triton X100 vê-se que o efeito lítico é proporcional à concentração do surfactante (C^{sat}) até que se atinja o valor de CMC ($2,5 \times 10^{-4}$ M - Tabela I), indicando que, a partir daí o início de hemólise acontece junto com a formação de micelas de Triton X100. Os valores de C^{sol} mostram que uma quantidade adicional de Triton X100 entra na membrana para que ocorra solubilização completa em concentração de $4,9 \times 10^{-4}$ M.

Para os Tweens a hemólise ocorre em concentrações bem acima da CMC ($1,2$ a $5,9 \times 10^{-5}$ M) e não há como explicar a dispersão de dados a não ser pelas condições não ideais das preparações: a) suspensões de eritrócitos de Ht alto, de grande viscosidade e b) necessidade de altas concentrações de Tween - de baixo poder hemolítico - aumentando a viscosidade da amostra e afastando-a de uma solução verdadeira.

Lichtenberg (1985) descreveu ainda dois outros parâmetros tirados indiretamente das curvas hemolíticas Re^{sat} e Re^{sol} relativos a razão molar efetiva surfactante/lipídio para saturação e solubilização, respectivamente.

A equação 5 mostra o tratamento proposto por Lichtenberg para o cálculo de D_w .

$$D_+ = R_e [L + 1 / K_b (R_e + 1)] \quad (5)$$

Segundo esse autor graficando-se a concentração de surfactante (D_+) para o início (C^{sat}) ou 100% de hemólise (C^{sol}) versus a concentração lipídica da membrana (L), obtem-se retas cujo intercepto no eixo das ordenadas corresponde a concentração máxima de surfactante em água, D_w , que é a CMC do surfactante. A figura 19, mostra

o tratamento para o cálculo de D_w dos surfactantes (Tween 20, 40, 80 e Triton X100). Os valores são referentes à tabela III e, depois de plotados, a inclinação da reta fornece o valor de Re , e o intercepto de Y o valor de D_w que corresponde a CMC do surfactante (Lichtenberg, 1985; Partearroyo *et al.*, 1992; Malheiros *et al.*, 1998).

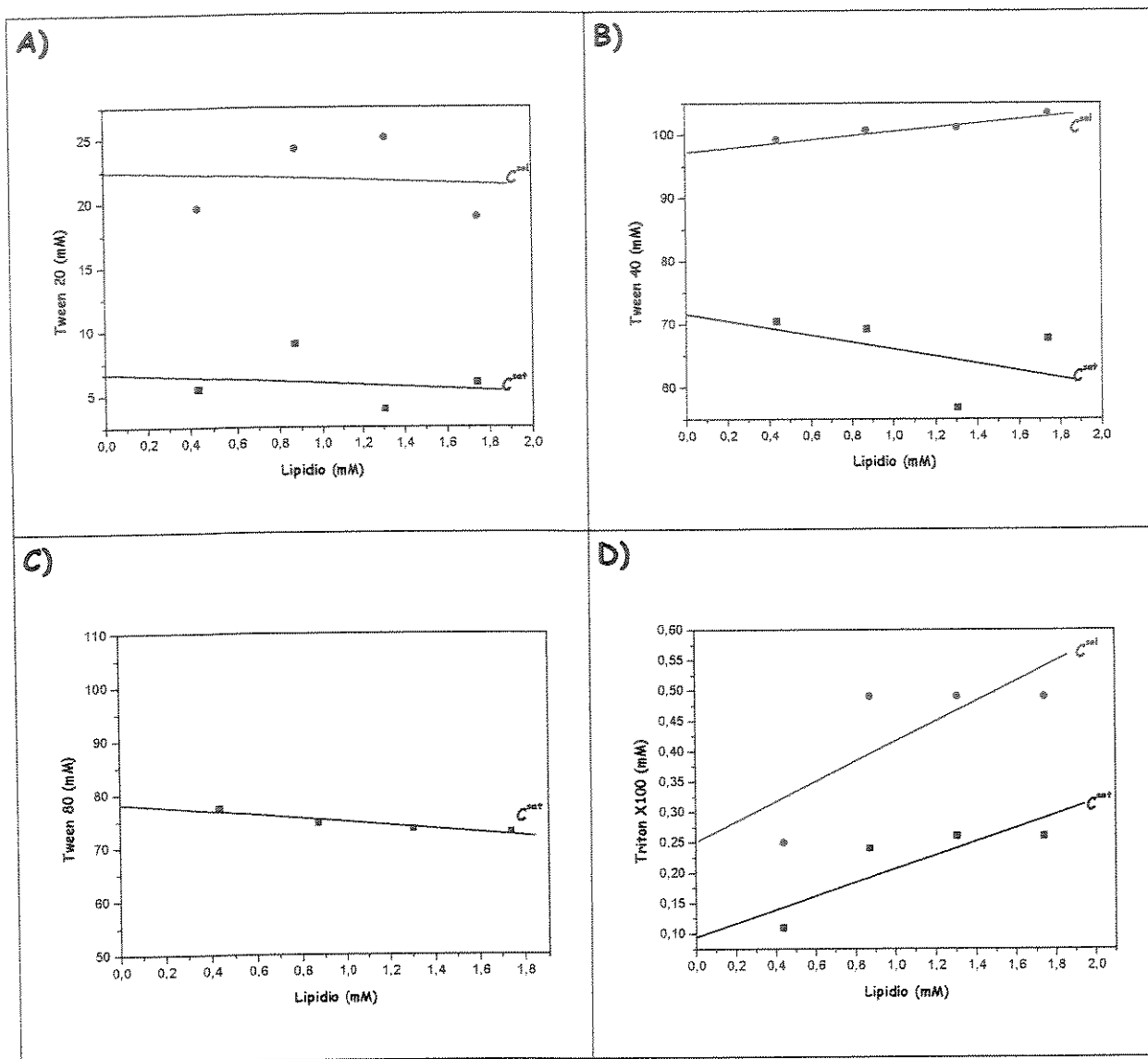


Figura 19 - Variação da concentração de surfactante para saturação (C^{sat}) e solubilização da membrana eritrocitária (C^{sol}) em função da concentração lipídica de eritrócitos. A=(Tween 20), B=(Tween 40), C=(Tween 80) e D=(Triton X100).

lise, divergindo do que ocorre com outros surfactantes e do que é preconizado pelo modelo proposto por Lichtenberg.

Acredita-se que a troca entre micela e bicamada seja responsável pela hemólise à medida que os lipídios da membrana são retirados da bicamada, e levadas para as micelas. Desta forma é comum encontrar o efeito lítico de surfactantes na faixa de sua CMC (como observado aqui para o Triton X100). Exemplos na literatura incluem o próprio Triton X100 (Partearroyo *et al.*, 1992) e o fenotiazínico trifluoperazina (Malheiros *et al.*, 1998).

Quando a hemólise não está associada a agregação do surfactante, como no caso do anestésico local dibucaína que provoca hemólise em concentrações inferiores a sua CMC (Malheiros *et al.*, 2000), o tratamento de Lichtenberg também não se aplica.

4.2.4 Testes Hemolíticos em Condições Isotônicas (Liberação de Potássio)

4.2.4.1 Medidas de Liberação de K^+ de Eritrócitos

As medidas de liberação de K^+ foram introduzidas no trabalho como um método alternativo para avaliar o dano causado à membrana pela ação dos surfactantes, em substituição ao método que avalia o mesmo efeito através da liberação de Hb. Tal método foi extremamente útil, pois como pudemos observar na figura 17 a solubilização (100% de hemólise de eritrócito) pelo Tween 80 não pode ser observada por interferência no marcador (Hb), fato que será discutido no item (4.3). Os gráficos abaixo (figura 20) mostram a curva de calibração do eletrodo de K^+ , conforme descrito por Katsu *et al.* (1989). Foram preparadas soluções conhecidas de KCl (1×10^{-5} e 1×10^{-3} M). A curva obtida é mostrada na Figura 20 (A) e uma faixa linear de medida é obtida entre 10 e 100 μ M de K^+ , como mostra a figura 20 (B).

A partir dessa curva padrão de KCl, pudemos calcular a concentração de K^+ liberado nos ensaios hemolíticos, como descrito anteriormente para os ensaios em condições isotônicas (3.2.6.1).

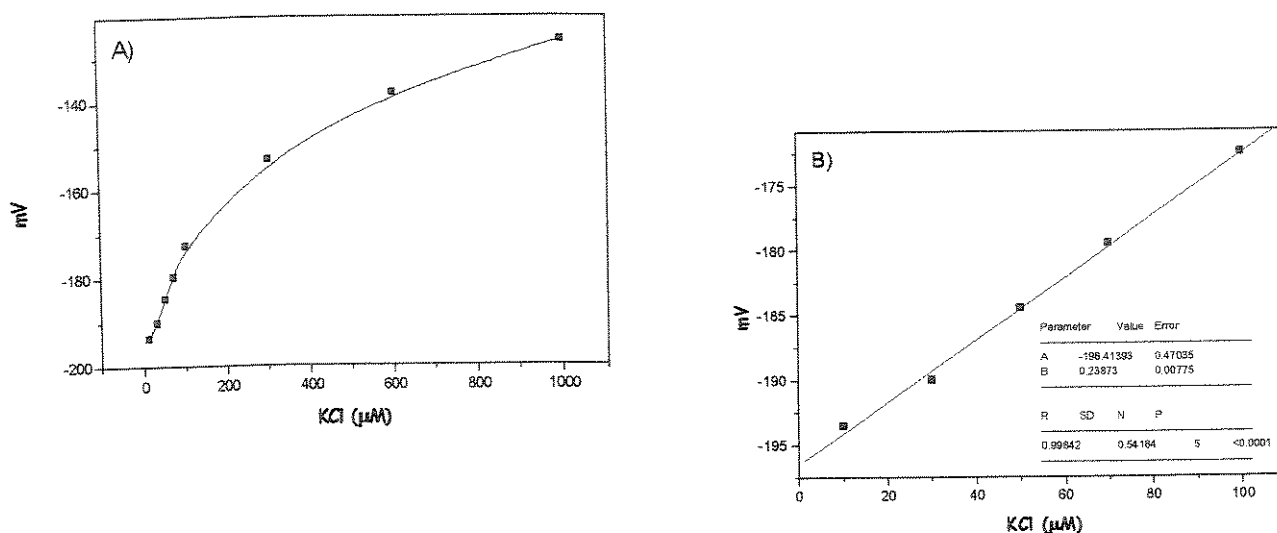


Figura 20 - Determinação potenciométrica do íon K^+ através de eletrodo específico. Curva padrão, preparada com concentrações crescentes de KCl em H_2O (A) 10 a 1000 μ M e (B) expansão da faixa linear da curva (10 a 100 μ M).

4.2.4.2 Medidas de Liberação de K^+ de Eritrócitos

As figuras 21, 22, 23 e 24 mostram o efeito dos surfactantes (Tween 20, 40, 80 e Triton X100) em eritrócitos íntegros em condições de osmolaridade e pH fisiológicos (PBS e pH 7,4), através da liberação de K^+ .

A curva padrão de KCl (Figura 20), auxiliou na análise da concentração de K^+ liberado entre 0 e 100% de hemólise. As medidas foram feitas a partir de alíquotas dos sobrenadantes dos ensaios de hemólise isotônica como mostrado no item 4.2.3, no Ht 10%, e a saída de K^+ foi medida através de um eletrodo específico para esse íon em soluções diluídas. O sobrenadante foi diluído de modo que a concentração de K^+ liberado estivesse dentro da faixa linear da curva padrão (figura 20/B). Após essa análise a % de hemólise foi calculada conforme a equação 3, usando-se os controles C_1 (0% de hemólise) e C_2 (100%).

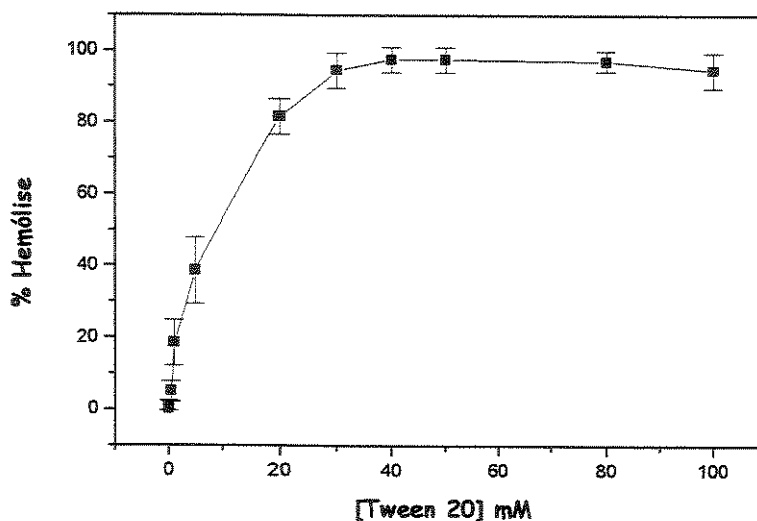


Figura 21 - Efeito hemolítico do Tween 20 sobre eritrócitos íntegros incubados em solução isotônica (PBS e pH 7,4) a 37°C, medidos pela liberação de K^+ .

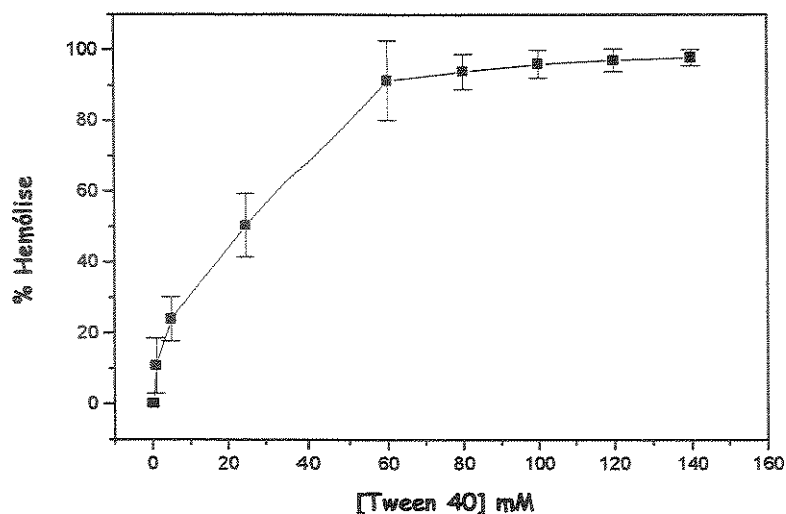


Figura 22 - Efeito hemolítico do Tween 40 sobre eritrócitos íntegros incubados em solução isotônica (PBS e pH 7,4) a 37°C, medidos pela liberação de K⁺.

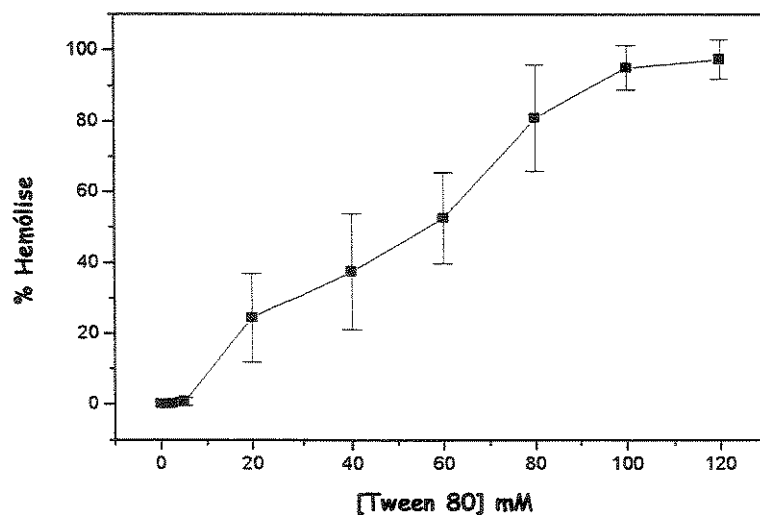


Figura 23 - Efeito hemolítico do Tween 80 sobre eritrócitos íntegros incubados em solução isotônica (PBS e pH 7,4) a 37°C, medidos pela liberação de K⁺.

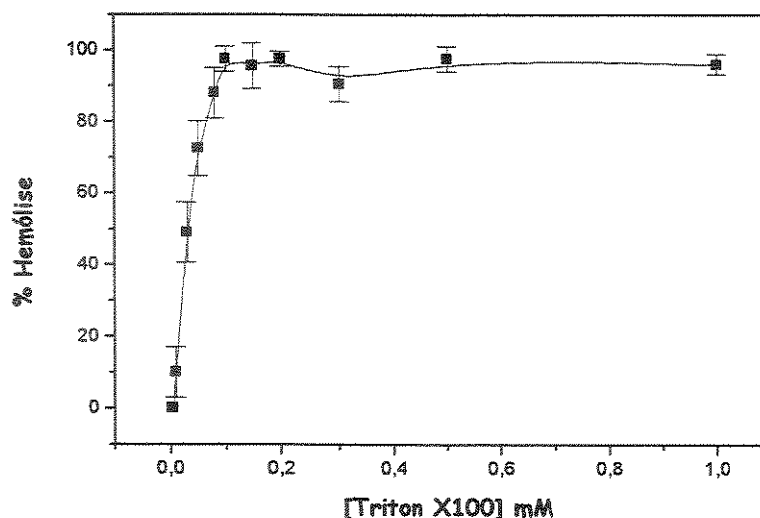


Figura 24 - Efeito hemolítico do Triton X100 sobre eritrócitos íntegros incubados em solução isotônica (PBS e pH 7,4) a 37°C, medidos pela liberação de K^+ .

A Tabela IV resume os dados dos valores de C^i , C^{sol} , R^i e R^{sol} para os surfactantes estudados.

Através da análise dos gráficos das figuras 21, 22, 23 e 24 e com o auxílio da tabela IV, concluímos que a saída de K^+ ocorre em concentrações menores de surfactante quando comparada com a saída de Hb. Os perfis das curvas de Hb e K^+ mostram outra diferença importante: enquanto as curvas de liberação de Hb têm aspecto sigmoidal caracterizando proteção à hemólise (primeiro platô), as de liberação de K^+ não apresentam, sugerindo que pequenas concentrações de surfactantes são suficientes para que o início da saída desse íon ocorra.

Têm-se sugerido que a interação de muitas moléculas com a membrana eritrocitária resulta na formação de poros na mesma. Dessa forma, os poros podem levar essas células a hemólise pelo mecanismo colóido-osmótico, que também permite o equilíbrio dos solutos, porém, retém a hemoglobina. A transferência de solutos faz com que as células inchem e, como consequência desse inchamento, ocorre o

rompimento dessas membranas. Esse mecanismo é evidenciado pela saída de K^+ intracelular, precedendo assim a saída da hemoglobina.

Talvez a saída de K^+ ocorra quando monômeros estão sendo incorporados à membrana (fase protetora, anterior à saturação) o que não acontece com a Hb, que precisa encontrar regiões de ruptura de consideráveis dimensões na membrana para sair do citossol. Por outro lado essa seria uma vantagem do experimento hemolítico medido pela liberação de Hb, pois ela fica retida no interior da célula o suficiente para registrar a incorporação de monômeros na membrana (partição), o que o K^+ não é capaz de registrar. Relatamos ainda que não é apropriado falar de C^{sat} para as medidas de saída de K^+ , pois esse parâmetro é usado apenas para a Hb. Outro parâmetro por nós utilizado é C^i , que corresponde a concentração de surfactante onde o íon K^+ começa a ser liberado do meio intracelular, portanto o início da liberação de K^+ não pode ser confundido com C^{sat} que refere-se a liberação de Hb.

Através da medida de liberação de K^+ foi possível medir os valores de C^{sol} para o Tween 80.

Tabela IV - Parâmetros Quantitativos do Efeito Hemolítico dos Surfactantes, medidos por liberação de K^+ . Condições experimentais como nas Figuras 21 a 24.

Surfactante	C^i (mM)	R^i	C^{sol} (mM)	R^{sol}
	Ht-10% (0,87 mM Lip)	Ht-10% (0,87 mM Lip)	Ht-10% (0,87 mM Lip)	Ht-10% (0,87 mM Lip)
Tween 20	0,5	0,57	16	18,39
Tween 40	0,8	0,92	55	63,22
Tween 80	5,0	5,74	95	109,19
Triton X100	0,01	0,01	0,08	0,09

Chi & Wu (1991), estudando o mecanismo de hemólise induzido por etanol, observaram que a liberação de K^+ ocorre imediatamente após a interação desse com a

membrana, enquanto a saída de hemoglobina ocorre 10 min após, justificado pela diferença de tamanho entre eles. O tempo para detecção do efeito hemolítico aumenta significativamente com a diminuição da concentração de etanol.

Os nossos estudos hemolíticos analisados através da liberação do K^+ intracelular, permitiram concluir que esse método pode ser utilizado como uma alternativa nos ensaios hemolíticos onde a hemoglobina não pode ser usada como sonda para essa análise.

Quando comparamos os valores de R^{sat} e R^{sol} dos ensaios hemolíticos pela saída de Hb e K^+ (tabela V), fica evidente que a saída de K^+ antecede a de hemoglobina, ou seja, em concentrações menores de surfactantes já é possível detectar a solubilização da membrana pela saída do K^+ .

Tabela V - Comparação entre os Valores de R^{sat} e R^{sol} (razão molar total surfactante:lipídio) obtidos dos Ensaios Hemolíticos pela Liberação hemoglobina e K^+ .

	R^{sat} (Hb)	R^i (K^+)	R^{sol} (Hb)	R^{sol} (K^+)
Surfactante	Ht-10% (0,87 mM Lip)	Ht-10% (0,87 mM Lip)	Ht-10% (0,87 mM Lip)	Ht-10% (0,87 mM Lip)
Tween 20	10,34	0,57	27,90	18,39
Tween 40	79,65	0,92	115,75	63,22
Tween 80	85,79	5,74	nd	109,19
Triton X100	0,27	0,01	0,56	0,09

nd = não determinado

A coeficiente de correlação entre os valores obtidos pelas duas metodologias é 0,858 e 0,998, respectivamente para os valores de R^{sat} e R^{sol} . Nos cálculos de R^{sol} os dados de Tween 80 não foram computados.

Os estudos hemolíticos através da liberação do íon K^+ ou de liberação de Hb nos permitiram confirmar que o surfactante Triton X100 possui maior efeito hemolítico, seguido do Tween 20, 40 e 80. O efeito hemolítico dentro da série Tween é característico, pois diminui com o aumento da hidrofobicidade da molécula

4.2.5 Testes Hemolíticos em Condições Hipotônicas

As figuras 25, 26, 27 e 28 mostram o efeito dos surfactantes (Tween 20, 40, 80 e Triton X100) sobre diferentes concentrações de eritrócitos fragilizados (Ht-5, 10, 15 e 20%). A medida de proteção foi feita por liberação de hemoglobina, medida espectrofotometricamente em solução hipotônica de PBS (NaCl 78 mM e pH 7,4).

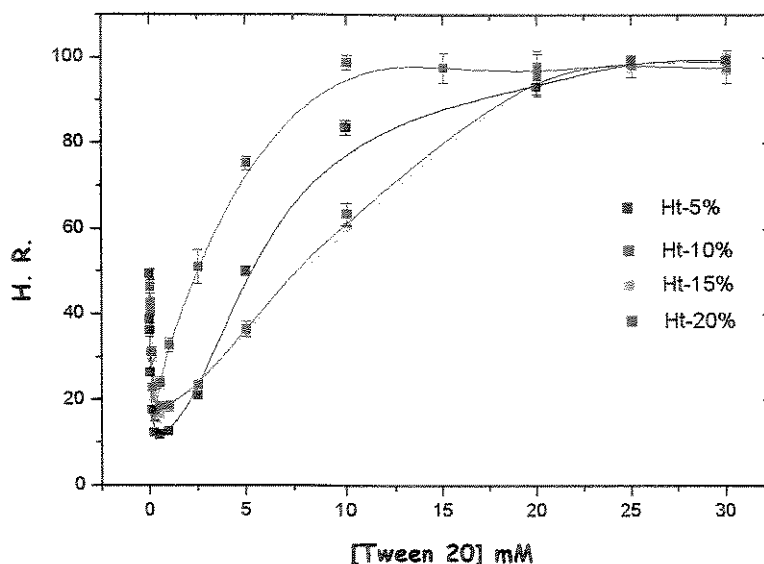


Figura 25 - Efeito da concentração de Tween 20 sobre eritrócitos fragilizados em solução hipotônica de PBS (NaCl 78 mM e pH 7,4), incubados por 15 min. a 37°C.

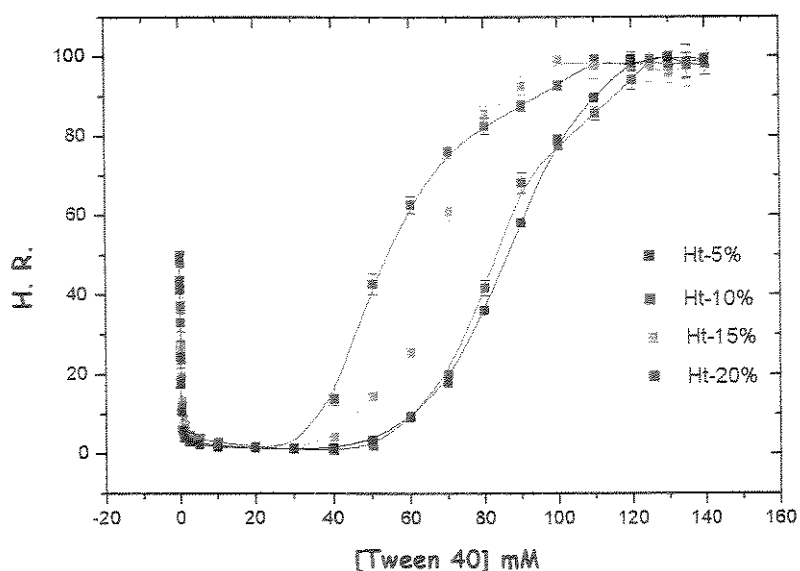


Figura 26 - Efeito da concentração de Tween 40 sobre eritrócitos fragilizados em solução hipotônica de PBS (NaCl 78 mM e pH 7,4), incubados por 15 min. a 37°C.

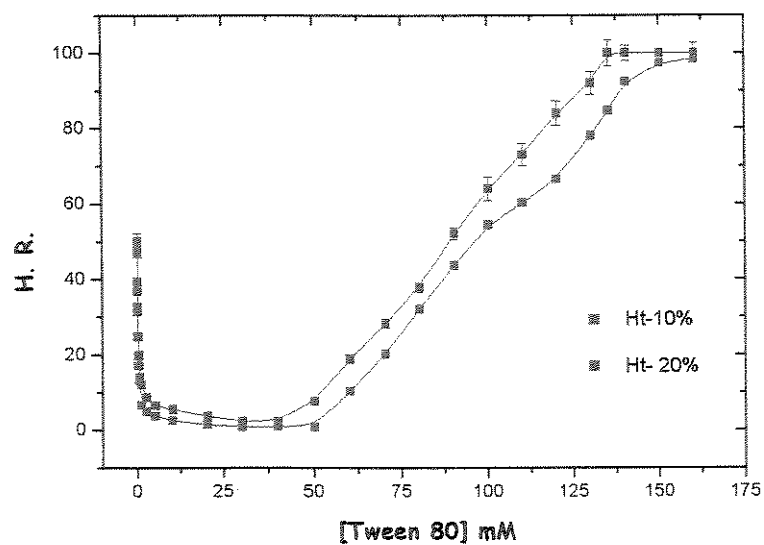


Figura 27 - Efeito da concentração de Tween 80 sobre eritrócitos fragilizados em solução hipotônica de PBS (NaCl 78 mM e pH 7,4), incubados por 15 min. a 37°C.

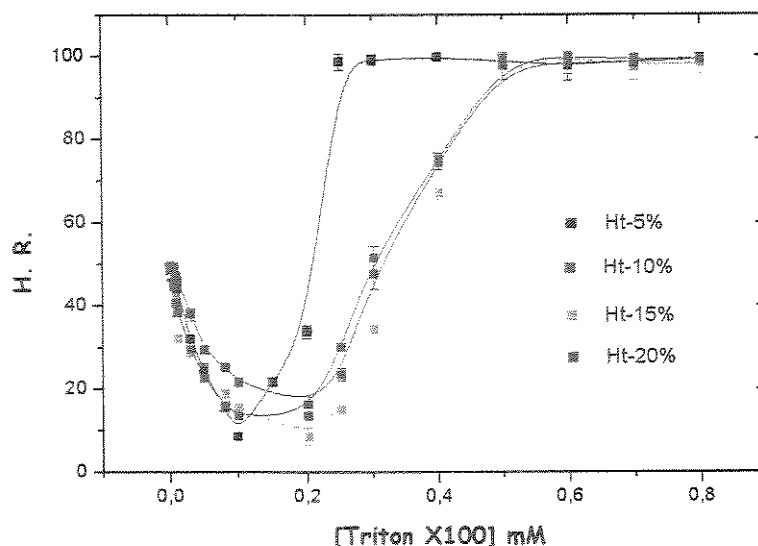


Figura 28 - Efeito da concentração de Triton X100 sobre eritrócitos fragilizados em solução hipotônica de PBS (NaCl 78 mM e pH 7,4), incubados por 15 min. a 37°C.

Podemos observar que todos os surfactantes estudados exercem efeito protetor em concentrações inferiores as de C^{sat} e C^{sol} (medidas de liberação de Hb - Tabela III) . A medida que a concentração de surfactante aumenta, observamos uma potencialização do efeito hemolítico. Enquanto o Triton X100 protege os eritrócitos em concentrações próximas a sua CMC, os Tweens estendem a proteção por uma faixa ampla de concentração - acima das CMCs. A amplitude da faixa de proteção é proporcional ao aumento da cadeia hidrofóbica dos Tweens (Tween 80 > Tween 40 > Tween 20), o que sugere que o Tween 20 tem maior efeito protetor, seguido do Tween 40 e Tween 80. Esses dados são melhor visualizados na tabela VI.

A proteção contra a lise hiposmótica é consequência da intercalação das moléculas de surfactantes na bicamada que poderia favorecer a resistência mecânica da mesma (Seeman *et al.*, 1966), ou ainda promover aumento da permeabilidade da membrana e um rápido fluxo de íons, diminuindo a pressão osmótica entre o meio intracelular e o tampão hipotônico (Hagerstränd & Isomaa, 1991). A partir dessas

curvas de proteção pudemos determinar a concentração de surfactante que causa o efeito protetor máximo, C^{prot} (Partearroyo *et al.*, 1992; Malheiros *et al.*, 1998). Todos os surfactantes da série Tween (20, 40 e 80) apresentam C^{prot} acima das suas CMCs (Tabela I), indicando que a interação desses surfactantes com a membrana eritrocitária acontece quando os mesmos estão na forma de micelas. Já para o Triton X100 que apresenta C^{prot} inferior a sua CMC, a interação com a membrana ocorre na forma de monômeros.

A tabela VI mostra valores de C^{prot} e R^{prot} retirados das figuras 25, 26, 27 e 28. C^{prot} , corresponde a concentração de máxima proteção e R^{prot} , corresponde a razão molar total surfactante:lipídio, para de máxima proteção.

Observamos que os valores de R^{prot} para todos os surfactantes são sempre inferiores aos valores de R^{sat} e R^{sol} medidos pela mesma metodologia, evidenciando o efeito bifásico dos surfactantes sobre membranas. Segundo Edwards & Almgreen (1990), a proteção corresponde a fase 1 da lise, apresentada na figura 6 (item 1.6).

Tabela VI - Efeito Protetor dos Surfactantes (Tween 20, 40, 80 e Triton X100) sobre Eritrócitos Fragilizados (condições hipotônicas) a 37°C. Valores referentes as figuras 28, 29, 30 e 31.

Surfactante	C^{prot} (mM)				R^{prot}			
	Ht-5% 0,44 mM Lip	Ht-10% 0,87 mM Lip	Ht-15% 1,30 mM Lip	Ht-20% 1,74 mM Lip	Ht-5% 0,44 mM Lip	Ht-10% 0,87 mM Lip	Ht-15% 1,304 mM Lip	Ht-20% 1,74 mM Lip
Tween 20	0,97	0,96	0,48	0,29	2,23	1,10	0,37	0,17
Tween 40	46,83	49,79	37,60	33,10	107,65	57,23	28,81	19,02
Tween 80	nd	50,0	nd	44,0	nd	57,47	nd	25,29
Triton X100	0,11	0,14	0,16	0,16	0,25	0,16	0,12	0,09

nd = não determinado

Os ensaios de proteção à hemólise nos revelaram informações importantes sobre a interação do surfactante com a membrana, confirmando a fase de troca de monômeros (incorporação do surfactante na membrana sem haver lise [fase I da figura 6).

Embora a lise membranar (fase III da figura 6) possa ser seguida por outros métodos o ensaio hemolítico revela detalhes importantes da resistência da membrana eritrocitária e da interação do surfactante (partição) com os lipídios da mesma.

4.3 Interação dos Surfactantes com a Hemoglobina

4.3.1 Padronização dos Ensaio de Oxidação

A figura 29, refere-se ao controle do dano oxidativo da Hb, onde utilizamos concentrações crescentes de $K_3Fe(CN)_6$. A Concentração de Hb (purificada, de acordo com o item 3.2.7) foi fixada em $20 \mu M$ para todos os experimentos e corresponde ao conteúdo celular de uma suspensão de hemáceas de Ht 0.15%.

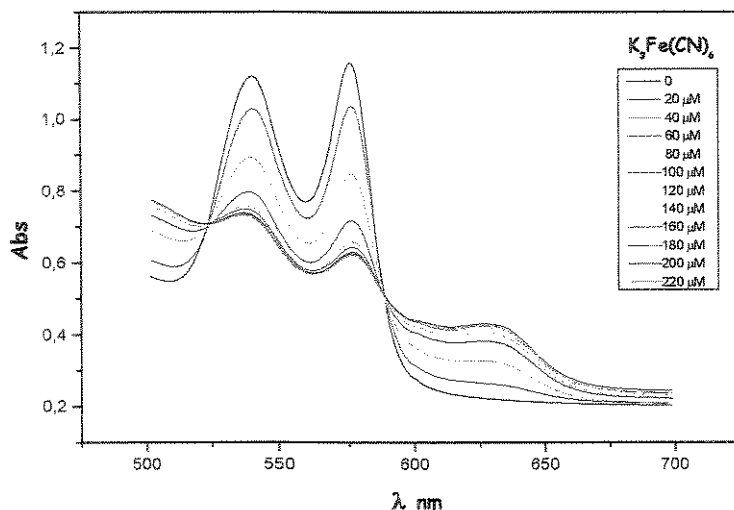


Figura 29 - Espectros de absorção (500-700 nm) de Hemoglobina purificada ($20 \mu M$) com concentrações crescentes de $K_3Fe(CN)_6$ em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4 a $37^\circ C$.

A figura 29 mostra a alteração espectral da Hb (perda dos picos de 540 e 576 nm e aparecimento de pico em 630 nm) que acompanha a oxidação da Hb por $K_3Fe(CN)_6$. Na concentração de 20 μM de Hb, observa-se que 100 μM de $K_3Fe(CN)_6$ são suficientes para oxidar completamente a oxi-Hb, conforme mostra figura 30.

O pH das amostras de Hb e surfactantes foi monitorado e não havia variação significativa até a concentração de 200 mM de Tween, eliminando a hipótese de efeito indireto, isto é, da alteração da estrutura da hemoproteína por efeito do pH.

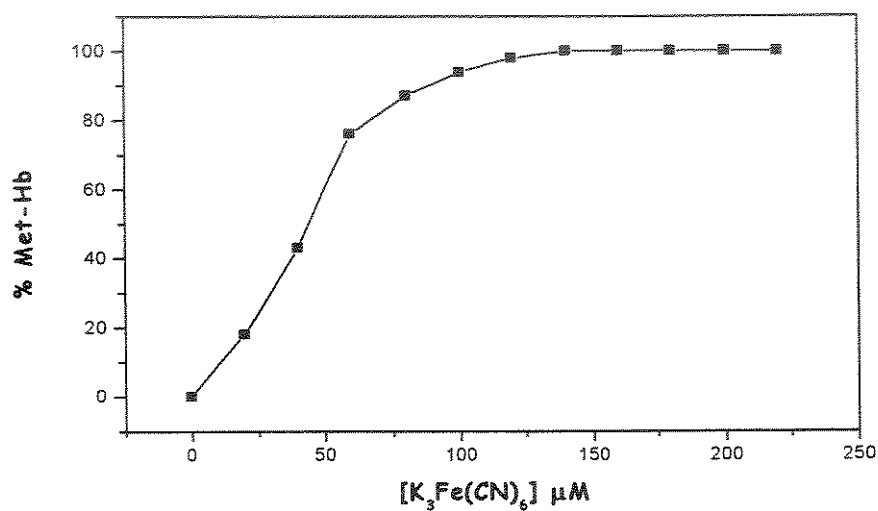


Figura 30 - Formação de met-Hb, induzida por $K_3Fe(CN)_6$, dados referentes a figura 29).

4.3.2 Testes de Oxidação da Hemoglobina por Ação dos Surfactantes

As figuras 31, 32, 33 e 34 mostram o efeito dos surfactantes (Tween 20, 40, 80 e Triton X100) na oxidação de hemoglobina purificada, conforme descrito no item 3.2.7.

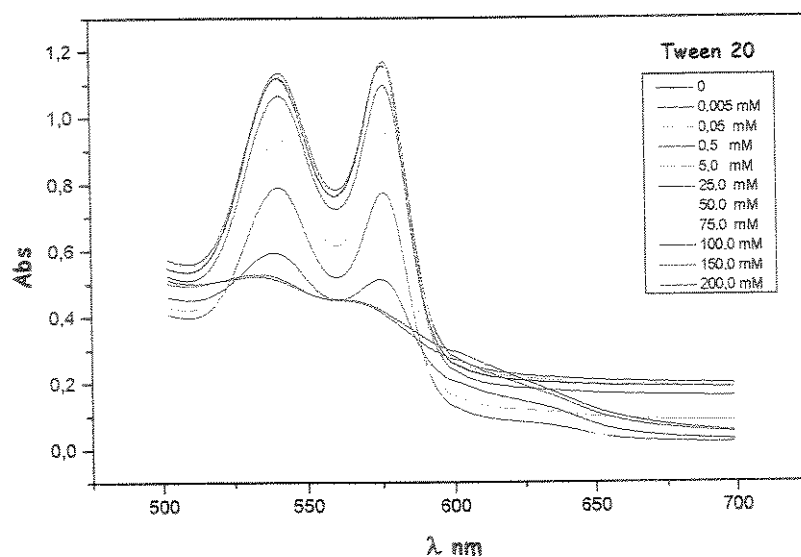


Figura 31 - Espectros de absorção (500-700 nm) de Hemoglobina purificada (20 μ M) com concentrações crescentes de Tween 20, em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4 a 37°C.

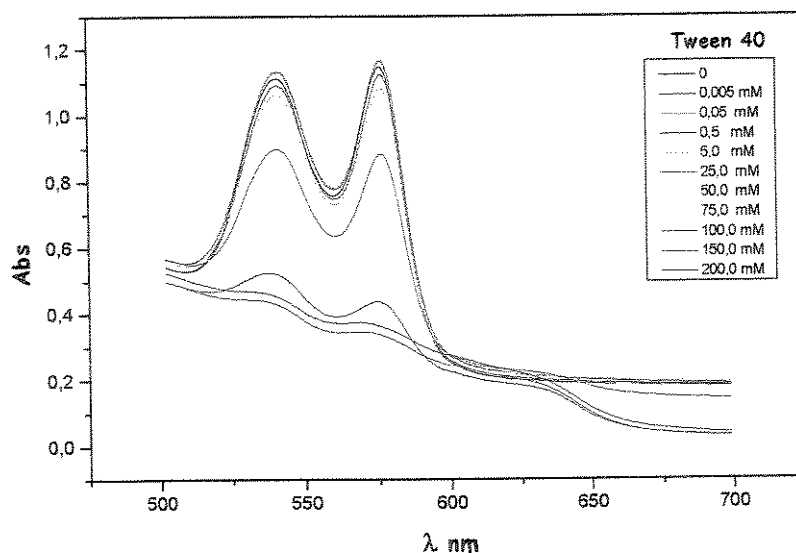


Figura 32 - Espectros de absorção (500-700 nm) de Hemoglobina purificada (20 μ M) com concentrações crescentes de Tween 40, em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4 a 37°C.

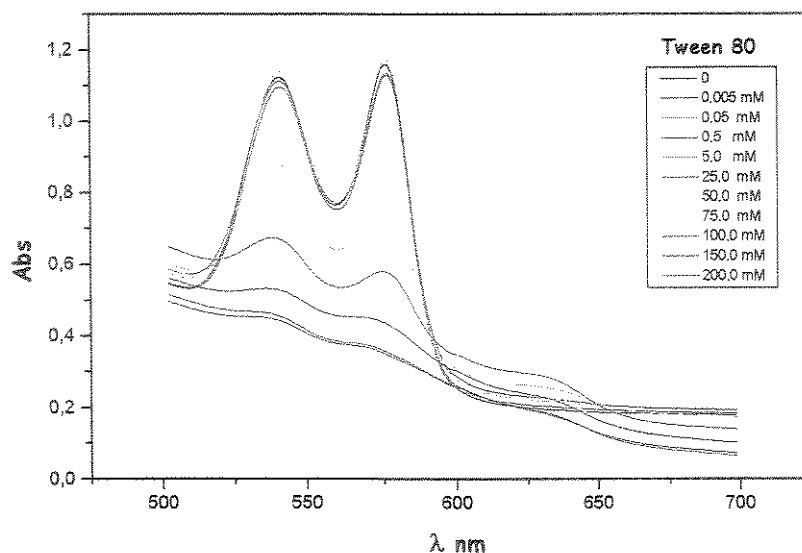


Figura 33 - Espectros de absorção (500-700 nm) de Hemoglobina purificada (20 μ M) com concentrações crescentes de Tween 80, em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4 a 37°C.

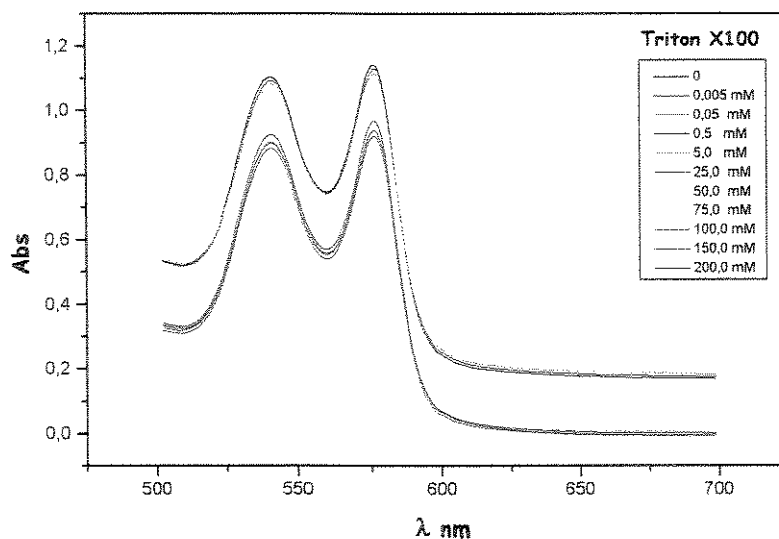


Figura 34 - Espectros de absorção (500-700 nm) de Hemoglobina purificada (20 μ M) com concentrações crescentes de Triton X100, em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4 a 37°C

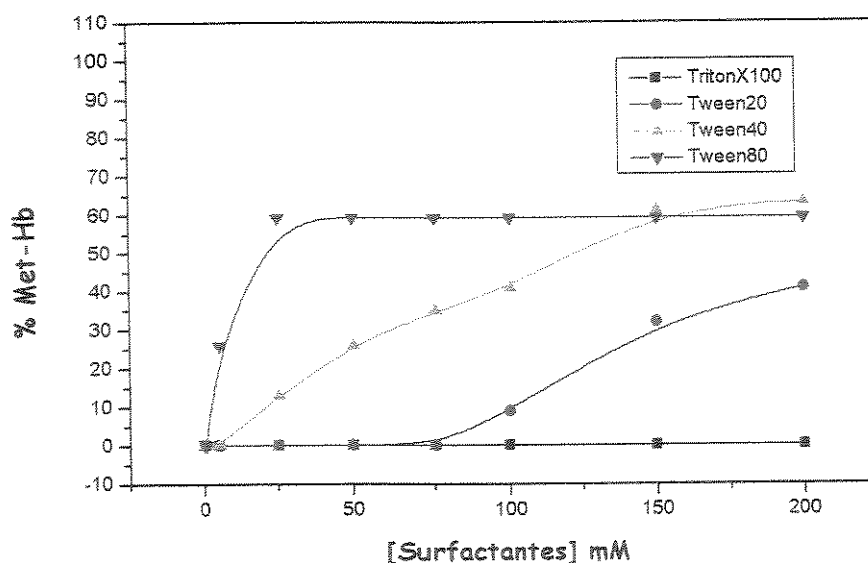


Figura 35 - Formação de met-Hb, induzida pelos surfactantes (Tween 20, 40, 80 e Triton X100), (referente às figuras 31 a 34).

A figura 35 resume os resultados encontrados referentes à oxidação da Hb, correlacionando a formação de meta-Hb (%).

A partir das curvas da figura 35 calculamos a razão molar surfactante:Hb para oxidação de 50% da Hb (Tabela VII). O maior poder oxidante do Tween 80 é evidenciado justificando a não determinação da hemólise total (C^{sol}) nos experimentos de hemólise isotônica (Figura 17).

Tabela VII - Razão Molar Surfactante:Hemoglobina para oxidação de 50% da Hb Pufirificada.

Surfactante	Conc. [M]	Surfactante:Hb Razão Molar
Tween 20	2×10^{-1}	10000:1
Tween 40	$1,3 \times 10^{-1}$	6400:1
Tween 80	$2,3 \times 10^{-2}$	1150:1
Triton X100	0	0
$K_3Fe(CN)_6$	$4,0 \times 10^{-5}$	2:1

O Tween 80 tem maior poder oxidante que os demais surfactantes da série pois promove a oxidação numa razão surfactante:Hb menor. O surfactante Triton X100 não apresentou poder oxidante sobre a Hb. Os valores de razão molar surfactante:Hb seguem a seguinte ordem: Tween 80 > Tween 40 > Tween 20.

A oxidação da hemoglobina por ação do Tween 80, é a razão de não se registrar 100% de lise nos ensaios hemolíticos (Fig. 17). A Hb oxidada deve formar hemicromos (precursores dos corpúsculos de Heiss) (Platt & Falcone, 1995) que são insolúveis e formam os "botões" observados no precipitado de amostras submetidas a altas concentrações de Tween 80. Como a hemólise é medida pela absorbância da Hb em solução, as leituras baixas (no sobrenadante) são erroneamente interpretadas como indicativas de pouca hemólise.

A observação visual de "botões" e coloração diferenciada da Hb (mais escura) foi o primeiro indicativo de oxidação. Assim, fica claro o efeito oxidante do Tween 80 sobre a Hb e a inadequação das medidas de absorção óptica para monitoramento da hemólise nessas condições. A alternativa encontrada para observarmos o efeito hemolítico do Tween 80 foi dosar a liberação de K^+ intracelular, que também é um indicativo do processo hemolítico, conforme apresentado no item 4.2.4.2.

É importante notar que a oxidação da Hb pelos Tweens é maior para os homólogos mais hidrofóbicos (Tween 80 > 40 > 20) e não compromete a interpretação dos estudos hemolíticos pois, na presença de membrana as concentrações de Tween necessárias para oxidação aumentam, uma vez que parte do surfactante interage com os lipídios da membrana. Além disso os valores de C^{sat} e C^{sol} medidos por liberação de K^+ são bem inferiores (Tabela IV) às concentrações de Tween para 50% de oxidação da Hb.

5 CONCLUSÕES

O efeito hemolítico dos Tweens (20, 40 e 80) medidos por liberação de Hb, acontece em razões molares Tween:membrana (7,34:1 , 81,05:1 e 90,49:1, respectivamente) maiores que as observadas com Triton X100 (0,22:1). Mesmo considerando o alto HLB dessa série, as razões molares são muito grandes em relação aos valores de literatura para outros surfactantes não-iônicos.

Surfactantes da série Tween (20, 40 e 80) têm efeito protetor e lítico acima das suas respectivas CMCs (59, 27 e 12 μ M), enquanto que para o Triton X100 este efeito ocorre próximo à sua CMC (0,25 mM). A razão molar surfactante:lipídio na membrana para proteção (R^{prot}) e hemólise (R^{sat} e R^{sol}) revela o perfil da atividade lítica desses surfactantes que segue a ordem a seguir: Triton X100 > Tween 20 > Tween 40 > Tween 80.

O efeito protetor dos Tweens tem característica ímpar, pois a proteção estende-se por uma faixa ampla de concentração, ocorre em concentrações superiores a CMC, e é proporcional a hidrofilicidade da molécula (Tween 20 > Tween 40 > Tween 80).

Concluimos assim que os Tweens são fracos agentes hemolíticos (em relação a outros surfactantes não-iônicos como o Triton X100), o que deve ser justificado pela baixa taxa de troca entre monômeros/lipídios de membrana levando a estabilização da membrana, evidenciada pelos ensaios de proteção à hemólise.

O tratamento proposto por Lichtenberg (1985) não se aplica na análise do efeito hemolítico dos surfactantes da série Tween pois os valores de R (razão molar surfactante/lipídio) são muito altos, a hemólise ocorre em concentrações superiores a

da CMC, sugerindo que a presença de micela não é o fator determinante da lise, como proposto no modelo de solubilização de membranas proposto por Lichtenberg.

Assim como a liberação de Hemoglobina, a liberação de potássio intracelular mostrou-se um bom marcador para análise dos parâmetros hemolíticos. A liberação de K^+ precede a de Hb e os valores de R^i e R^{sol} são, conseqüentemente, inferiores aos determinados espectrofotometricamente.

O Tween 80 tem um grande poder oxidante sobre a Hb, seguido do Tween 40 e Tween 20. O surfactante Triton X100 não apresentou poder oxidante sobre a Hb. O efeito oxidante do Tween 80 em altas concentrações, impediu a determinação do 100% de hemólise, pela dosagem de hemoglobina em solução. Medidas feitas pela liberação de K^+ mostraram que o Tween 80 induz 100% de hemólise, como observado para os demais surfactantes da série.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acharya, K. R.; Bhattacharyya, S. C. & Moulik, S. P. (1999). Effects of carbohydrates on the solution properties of surfactants and dye-micelle complexation. *J. Photoch. Photobio. A*. 122:47-52.

Al-Najjar, A. R. (1989). *J. Biol. Sci. Res.* 20:85.

Antonini, E. & Brunori, M. (1975). In: *The red blood cell. Hemoglobin and methemoglobin*, 753-797. Aca. Press, London.

Attwood, D. & Florence, A. T. (1983). *Surfactant Systems-Their Chemistry, Pharmacy and Biology*, 2^o. ed, N.Y.London. Chapman and Hall.

Banghan, J. A. & Lea, E. J. A. (1978). The interaction of detergents with bilayer lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 511:388-396.

Barbosa, N. M & Meirelles, N. C. (1994). Leghemoglobin: physical chemical properties, *Rer. Bras. Bot.* 17:183-188.

Basheer, S.; Mogi, K. & Nakajima, M. (1995). Surfactant-modified lipase for the catalysis of the interesterification of triglycerides and fatty-acids. *Biotechnol. Bioeng.* 45:187-195.

Bassetti, L.; Hagendoorn, M. & Tramper, J. (1995). Surfactant-induced non-lethal release of anthraquinones from suspension cultures of *morinda citrifolia*. *J. Biotechnol.* 39:149-155.

Begona, R. M. ; Prado , A. ; Goñi , F. M. & Alonso, A. (1994). An assessment of the biochemical applications of the non-ionic surfactant Hecameg. *Biochim. Biophys. Acta* 1193:301-306.

Benassi, L.; Bertazzoni, G. & Seidenari, S. (1999). In vitro testing of tensides employing monolayer cultures: A comparison with results of patch tests on human volunteers. *Con. Derma.* 40:38-44.

Benet, L. Z.; Kroetz, D. L. & Sheiner, L. B. (1996). *Farmacocinética. A dinâmica da absorção, distribuição e eliminação dos fármacos*. In: *As bases farmacológicas da terapêutica*, 9th ed, Mc Graw-Hill, Santiago de Chile, 3-21.

Bergh, M.; Magnusson, K.; Nilsson, J. L. G. & Karlberg, A. T. (1997). Contact allergenic activity of Tween 80^(TM) before and after air exposure. *Cont. Dermat.* 37:9-18.

Berman, M.; Benesch, R. & Benesch, R. E. (1977). The removal of organic phosphates from Hb. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 26:162-167.

Bielawski, J. (1989). Two types of haemolytic activity of detergents. *Biochim. Biophys. Acta* 1035:214-217.

Bielawski, J. ; Mrówczyńska, L. & Konarczak, M. (1995). Hemolytic activity of the non-ionic detergents Tween 80 and Triton X100. *Biol. Bull. Poznan* 32:27-41.

Bogner, P.; Wheatley, D. N.; Borbély, C. & Miseta, A. (1996). Albumin can reverse the release of potassium from human erythrocytes treated with the non-ionic detergent, Brij 58. *Cell. Biol. Int.* 11:741-749.

Braun, K. R.; Davidson, K. M.; Henry, M. & Nielsen, H. C. (1999). Severe pulmonary hemorrhage in the premature newborn infant: Analysis of presurfactant and surfactant. *Biol. Neonate* 75:18-30.

Brenner, C.; Jan, G.; Chevalier, Y. & Wroblewski, H. (1995). Evaluation of the efficacy of zwitterionic dodecyl carboxybetaine surfactants for the extraction and the separation of mycoplasma membrane protein antigens. *Anal. Biochem.* 224:515-523.

Bull, B. S.; Breton-Gorius, J. & Beutler, E. (1990). Morphology of the erythron. In *Hematology*, 4th ed, Mc Graq-Hill, New York, 297-316.

Carafa, M.; Lucania, G.; Marchei, E.; Dolo, V.; Giammatteo, M.; Torrisi, M. R.; Santucci, E. & Pavan, E. (1999). Morphological analysis of the interaction of charged surfactant vesicles (SVs) with human cultured cells. *Biotech. Histochem.* 74:77-84.

Cardoso-Pelaez, F.; Brooks, P. J.; Stedeford, T. ; Song, S. J. & Sanchez-Ramos, J. (2000). DNA damage, repair, and antioxidant systems in brain regions: A correlative study. *Free Rad. Biol. Med.* 28:779-785.

Castanon, M. & Wilke, C. R. (1981). Effects of the surfactant Tween-80 on enzymatic-hydrolysis of newspaper. *Biotechnol. Bioeng.* 23:1365-1372.

- Castro, V. R. O.; Ashwood, E. R.; Wood, S. G. & Vernon, L. P. (1990). Hemolysis of erythrocytes and fluorescence polarization changes elicited by peptide toxins, aliphatic alcohols, related glycols and benzylidene derivatives. *Biochim. Biophys. Acta* 1029:252-258.
- Cauchey, W. S. (1967). Porphyrin proteins and enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 36:611-644.
- Chang, G. G.; Huang, T. M.; Huang, S. M.; Chou, W. Y. (1994). Dissociation of pigeon-liver malic enzyme in reverse micelles. *Eur. J. Biochem.* 225:1021-1027.
- Chasis, J. A. & Shohet, S. B. (1987). Red cell biochemical anatomy and membrane properties. *Ann. Rev. Physiol.* 49:237-248.
- Chen, J. Y. & Huestis, W. H. (1997). Role of membrane lipid distribution in chlorpromazine-induced shape change of human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1323:299-309.
- Chernitsky, E. A. & Senkovich, O. A. (1997). Erythrocyte hemolysis by detergents. *Membr. Cell. Biol.* 11:475-85.
- Chi, L. M. & Wu, W. G. (1991). Mechanism of hemolysis of red blood cell mediated by ethanol. *Biochim. Biophys. Acta* 1062:46-50.
- Chiu, D.; Lubin, B. & Shohet, S. B. (1982). Peroxidative reactions in red cell biology. In *Free Radicals in Biology* vol. V pp 115-160 (Pryor, W. A. ed.) Academic Press, New York.
- Cho, J. K.; Azuma, N.; Lee, C. H.; Yu, J. H. & Kanno, C. (2000). Purification of membrane-bound lactoferrin from the human milk fat globule membrane. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64:633-635.
- Choudhari, K. B. ; Labhasetwar, V. & Dorle, A. K. (1994). Liposomes as a carrier for oral administration of insulin: Effect of formulation factors. *J. Microencapsul.* 11:319-325.
- Chung, J. E.; Yokoyama, M.; Yamato, M.; Aoyagi, T.; Sakurai, Y. & Okano, T. (1999). Thermo-responsive drug delivery from polymeric micelles constructed using block copolymers of poly(N-isopropylacrylamide) and poly(butylmethacrylate). *J. Control. Rel.* 62:115-127.

Clemens, M. R. & Waller, H. D. (1987). Lipid peroxidation in erythrocytes. *Chem. Phys. Lipids* 45:251-268.

Cohen, G. & Hochstein, P. (1964). Generation of hydrogen peroxide in erythrocytes by hemolytic agents. *Biochemistry* 35:895-900.

Connor, J.; Gillum, K. & Schroit, A. J. (1990). Maintenance of lipid asymmetry in red blood cells and ghosts: effect of divalent cations and serum albumin on the transbilayer distribution of phosphatidylserine. *Biochim. Biophys. Acta* 1025:82-86.

Crispends, C. & Sorrenson, G. (1988). *Anticancer Res.* 8:1341.

Cross, J. (1987). *Nonionic Surfactants - Chemical Analysis*. Marcel Dekker, New York, vol. 19.

Cummins, T. J. & Ekeze, T. (1997). Methods of extracting deoxyribonucleic acids without using a proteolytic enzyme. *Biotechnol. Adv.* 15:389-393.

Degnan, A. J.; Buyong, N. & Luchansky, J. B. (1993). Antilisterial activity of pediocin AcH in model food systems in the presence of an emulsifier or encapsulated within liposomes. *Int. J. Food Microbiol.* 18:127-138.

Derome, A. E. (1987). *Modern NMR Techniques for Chemistry Research*, Pergamon Press, New York.

Devaux, P. F. (1991). Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. *Biochemistry* 30:1163-1173.

Dincer, Y.; Akcay, T.; Komukogku, D. & Hatemi, H. (1999). Erythrocyte susceptibility to lipid peroxidation in patients with coronary atherosclerosis. *Acta. Med. Okayama.* 53:259-264.

Donbrow, N.; Azaz, E. & Pillerdorf, A. (1978). Autoxidation of polysorbates. *J. Pharm. Sci.* 67:1676-1681.

Edwards, K.; Almgreen, M. (1990). Kinetics of surfactant-induced leakage and growth of unilamellar vesicles. *Progr. Coll. & Polymer Sci.* 82:190-197.

Faivre, B.; Menu, P.; Labrude, P. & Vigneron, C. (1998). Hemoglobin autooxidation/oxidation mechanisms and methemoglobin prevention or reduction

processes in the bloodstream - Literature review and outline of autooxidation reaction. *Artif. Cell Blood Sub.* 26:17-26.

Forney, C. E. & Glatz, C. E. (1995). Extraction of charged fusion proteins in reversed micelles: Comparison between different surfactant systems. *Biotechnol. Prog.* 11:260-4.

Galembeck, E.; Alonso, A. & Meirelles, N. C. (1998). Effects of polyoxyethylene chain length on erythrocyte hemolysis induced by poly[oxyethylene (n) nonylphenol] non-ionic surfactants. *Chem. Biol. Inter.* 113:91-103.

Garrett, R. H. & Grisham, C. M. (1995). *Biochemistry Molecular aspects of cell biology*, Saunders College Pub.

Gennis, R. R. (1989). *Biomembranes-Molecular Structure and Function*, N. Y. Springer Verlag, Inc., p-95.

Glover, R. E.; Smith, R. R.; Jones, M. V.; Jackson, S. K. & Rowlands, C. C. (1999). An EPR investigation of surfactant action on bacterial membranes. *FEMS Microbiol. Lett.* 177:57-62.

Goldberg, B. & Stern, A. (1976). Superoxide anion as a mediator of drug-induced oxidative hemolysis. *J. Biol. Chem.* 251:6468-6470.

Goñi, F. M.; Urbaneja, M. A.; Arrondo, J. L. R.; Alonso, A.; Durrani, A. A. & Chapman, D. (1986). The interaction of phosphatidylcholine bilayers with Triton X-100. *Eur. J. Biochem.* 160:659-665.

Greff Jr, R. A. & Flangan, P. W. (1963). The characterization of nonionic surfactants by NMR. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 43:118-120.

Griffin, W. C. (1949). *J. Soc. Cosmet. Chem.* 1:311-

Hägerstrand, H. & Isomaa, B. (1989). Vesiculation induced by amphiphiles in erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 982:179-186.

Hägerstrand, H. & Isomaa, B. (1991). Amphiphile induced antihaemolysis is not causally related to shape changes and vesiculation. *Chem. Biol. Inter.* 79:335-347.

- Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. (1989). In: Free radicals in biology and medicine. (B. Halliwell and J. M. C. Gutteridge eds), pp 188. Clarendon Press, Oxford.
- Harano, T.; Yamaguchi, T. & Kimoto, E. (1994). Hemolytic properties of CA^{2+} treated human erythrocytes under hydrostatic pressure. J. Biochem. 116:773-777.
- Helenius, A. & Simons, K. (1975). Solubilization of membranes by detergents. Biochim. Biophys. Acta 415:29-80.
- Helenius, A.; Mccaslin, D.R.; Fries, E. & Tanford, C. (1979). Properties of detergents. Meth. Enzymol. 56:734-749.
- Hill, R. A. ; Reddi, S. ; Kenney, M. E. ; Ryan, J.; Liaw, L. H. ; Garret, J. ; Shirk, J. ; Cheng, G. ; Krasieva, T. & Berns, M. W. (1995). Photodynamic therapy of ocular melanoma with bis silicon 2,3-naphthalocyanine in a rabbit model. Invest. Ophth. Visc. Sci. 36:2476-2481.
- Hinze, W.L. & Pramauro, E. (1993). A critical-review of surfactant-mediated phase separations (cloud-point extractions) - theory and applications. Crit. Ver. Anal. Chem. 24:133-177.
- Hiol, A.; Jonzo, M. D.; Druet, D. & Comeau, L. (1999). Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis f. hiemalis*. Enz. Microb. Tech. 25:80-87.
- Huang, S. Y. & Lee, Y. C. (1994). Separation and purification of horseradish peroxidase from *Azorella rusticana* root using reversed micellar extraction. Biosep. 4:1-5.
- Irie, T. & Uekama, K. (1997). Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 3. Toxicological issues and safety evaluation. J. Pharm. Sci. 86:147-162.
- Isomaa, D. ; Hägerstrand, H. ; Paatero, G. & Engblom, A. C. (1986). Permeability alterations and antihaemolysis induced by amphiphiles in human erythrocyte. Biochim. Biophys. Acta 860:510-524.
- Israelachvili, J. N. (1985). Intermolecular and surface forces with applications to colloidal and biological systems. New York, Academic. Press.

Jayasuriya, N.; Bosak, S. & Regen, S. L. (1990). Design, synthesis, and activity of membrane-disrupting bolaphiles. *J. Am. Chem. Soc.* 112:5844-5850.

Janetzko, K.; Schlenke, P. & Kluter, H. (1999). The flow rate significantly influences the leukocyte depletion rate during prestorage in-line filtration of platelet concentrates. *Transfus. Sci.* 21:123-128.

Jobe, A. H. (1993). Drug therapy- Pulmonary surfactant therapy. *New Engl. J. Med.* 328:861-868.

Johannsson, J. & Curstedt, T. (1997). Molecular structures and interactions of pulmonary surfactant components. *Eur. J. Biochem.* 244:675-693.

Jones, M. N. (1999). Surfactants in membrane solubilisation. *Int. J. Pharm.* 177:137-159.

Kahana, E.; Streichman, S. & Silver, B. L. (1991). The role of electrostatic forces in the interaction between the membrane and cytoskeleton of human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1066:1-5.

Kamiya, N.; Goto, M. & Nakashio, F. (1995). Surfactant-coated lipase suitable for the enzymatic resolution of menthol as a biocatalyst in organic media. *Biotechnol. Progr.* 11:270-275.

Katsu, T.; Kuroko, M.; Morikawa, T.; Sanchika, K.; Fujita, Y.; Yamamura, H. & Uda, M. (1989). Mechanism of membrane damage induced by the amphipathic peptides gramicidin S and melittin. *Biochim. Biophys. Acta* 983:135-141.

Keilin, D. & Ryley, J. F. (1953). Haemoglobin in protozoa. *Nature.* 172:451-451.

Kitani, T. & Fujisawa, H. (1981). Effects of detergent on ornithine decarboxylase from rat-liver stabilization and renaturation. *Eur. J. Biochem.* 119:177-181.

Koga, K.; Murakami, M. & Kawashima, S. (1997). Contribution of hydrophobicity of nonionic detergents to membrane lipid fluidity and disopyramide uptake by rat intestinal brush-border membrane vesicles. *Biol. Pharm. Bull.* 20:674-679.

Komives, C. F.; Lilley, E. & Russel, A. J. (1994). Biodegradation of pesticides in nonionic water-in-oil microemulsions of Tween-85 - relationship between micelle structure and activity. *Biotechnol. Bioeng.* 43:946-959.

Konukoglu, D.; Akcay, T. & Erdem, T. (1998). Susceptibility of erythrocyte lipids to oxidation and erythrocyte antioxidant status in myocardial infarction. *Clin. Biochem.* 31:667-671.

Kurata, M.; Suzuki, M. & Agar, N. S. (1993). Antioxidant systems and erythrocyte life-span in mammals. *Comp. Biochem. Phys. B.* 106:477-487.

Kwon, G. S. & Okano, T. (1999). Soluble self-assembled block copolymers for drug delivery. *Pharm. Res.* 16:597-600.

Lauriault, V. V. M. & O'Brien, P. J. (1991). Disulfiram may mediate erythrocyte hemolysis induced by diethyldithiocarbamate and 1,4-naphthoquinone-2-sulfonate. *Arch. Bioch. Biophys.* 284:207-214.

Lawrence, M. J.; Lawrence, S. M. & Barlow, D. J. (1997). Aggregation and surface properties of synthetic double-chain non-ionic surfactants in aqueous solution. *J. Pharm. Pharmacol.* 49:594-600.

Lee, B.; McKenna, K. & Bramhall, J. (1985). Kinetic studies of human erythrocyte membrane resealing. *Biochim. Biophys. Acta* 15:128-134.

Lehninger, A. L.; Nelson, D. L. & Cox, M. M. (1993). *Principles of Biochemistry*. Worth Publisher, NY.

Li, C. Y.; Zimmerman, C. L. & Wiedmann, T. S. (1996). Solubilization of retinoids by bile salt/phospholipid aggregates. *Pharm. Res.* 13:907-913.

Liang, E. & Hughes, J. A. (1998). Membrane fusion and rupture in liposomes: Effect of biodegradable pH-sensitive surfactants. *J. Membr. Biol.* 166:37-49.

Lichtenberg, D. (1985). Characterization of the solubilization of lipid bilayers by surfactants. *Biochim. Biophys. Acta* 821:470-478.

Lieber, M. R.; Lange, Y.; Weinstein, R. S. & Steck, T. L. (1984). Interaction of chlorpromazine with the human erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* 259:9225-9234.

Loizaga, B.; Gurtubay, I. G.; Macarulla, J. M.; Goñi, F. M. & Gómez, J. C. (1979). Membrane solubilization by detergents, and detergent/protein ratios. *Biochem. Soc. Trans.* 7:148-150.

Lux, S. E. (1988). Hereditary in the membrane or metabolism of the red cell. In: Cecil. Textbook of Medicine, 18 th ed, W. B. Saunders Company. Philadelphia, 909-917.

Macnab, G. & Harington, J. S. (1967). Haemolytic activity of asbestos and other mineral dusts. *Nature* 214:522-523.

Malcolmson, C.; Satra, C.; Kantaria, S.; Sidhu, A. & Lawrence, M. J. (1998). Effect of oil on the level of solubilization of testosterone propionate into nonionic oil-in-water microemulsions. *J. Pharm. Sci.* 87:109-116.

Malheiros, S. V. P.; De Paula, E. & Meirelles, N. C. (1998). Contribution of trifluoperazine/lipid ratio and drug ionization to hemolysis. *Biochim. Biophys. Acta* 1373:332-340.

Malheiros, S. V. P.; Meirelles, N. C. & De Paula, E. (2000). Pathways involved in trifluoperazine, dibucaine and praziquantel induced hemolysis. *Biophys. Chem.* 83:89-100.

Maraculla, J. M.; Alonso, A.; Arrondo, J. L. R.; Gonz  les-Ma  nas, J. M.; Go  ni, F. M.; Gurtubay, J. L. G.; Prado, A. & Urbaneja, M. A. (1989). Membrane solubilization by the non-ionic detergent Triton X100. A comparative study including model and cell membranes. *Rev. Esp. Fisiol.* 45:1-8.

Marques, M. B. & Meirelles, N. C. (1995) erythrocytes of *glossoscolex-paulistus* (righi) (oligochaeta, glossoscolecidae) - effects of divalent ions, acid-alkaline transition and alkali and urea denaturation. *Comp. Biochem. Phys. B.* 111:311-318.

Martinez-Cayuela, M. (1995). Oxidative free radicals and human disease. *Biochimie* 77:147-161.

Middelkoop , E. ; Lubin , B. H. ; Bevers , E. M. Op Den Kemp , J. A.; Comfurius , P. ; Chiu , D. T. Y.; Zwall , R. F. A. ; Deenen, L. L. M. & Roelofsen, B. (1988). Studies on sickled erythrocytes provide evidence that the asymmetric distribution of phosphatidylserine in the red-cell membrane is maintained by both atp-dependent translocation and interaction with membrane skeletal proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 937:281-288.

Minuth, T.; Thommes, J. & Kula, M. R. (1995). Extration of cholesterol oxidase from nocardia-rhodochrous using a nonionic surfactant-based aqueous 2-phase system. *J. Biotechnol.* 38:151-164.

Misra, H. P. & Fridovich, I. (1972). The generation of superoxide radical during autoxidation of hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 247:6960-6962.

Molloy, M. P.; Herbert, B. R.; Walsh, B. J.; Tyler, M. L.; Traini, M.; Sanchez, J. C.; Hochstrasser, D. F.; Williams, K. L. & Gooley, A. A. (1998). Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis. *Electroph.* 19:837-844.

Montgomery, R. (1994). *Bioquímica - Uma Abordagem Dirigida por Casos*, 5ª. Ed. São Paulo, pg.277.

Moro, F.; Goñi, F. M. & Urbaneja, M. A. (1993). Fluorescence quenching at interfaces and the permeation of acrylamide and iodide across phospholipid bilayers. *FEBS Lett.* 330:129-132.

Mysels, K. J. & Mukerjee, P. (1979). Reporting experimental data dealing with critical micellization concentration (CMC's) of aqueous surfactant systems. *Pure & Appl. Chem.* 51:1083-1089.

Nampoothiri, K. M. & Pandey, A. (1998). Membrane permeability and glutamate excretion by *brevibacterium sp.* *J. Sci. Ind. Res.* 57:640-643.

Nagababu, E. & Rifkind, J. M. (1998). Formation of fluorescent heme degradation products during the oxidation of hemoglobin by hydrogen peroxide. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 247:592-596.

Neugebauer, J. (1994). *A Guide to the Properties and Uses of Detergents in Biology and Biochemistry*. Calbiochem-Novabiochem Int. La Jolla.

Ohnishi, M. & Sagitani, H. (1993). The effect of nonionic surfactant structure on hemolysis. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 70:679-684.

Ostolaza, H.; Bartolome, B.; Ortis-De-Zarate, I.; De-La-Cruz, F.; Goñi, F. M. (1993). Release of lipid vesicle contents by the bacterial protein toxin alpha-haemolysin. *Biochim. Biophys. Acta* 1147:81-88.

Pape, W. J. W.; Pfannenbecker, U.; Argembeaux, H.; Bracher, M.; Esdaile, D. J.; Hagino, S.; Kasai, Y. & Lewis, R. W. (1999). COLIPA validation project on in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients and finished products (phase I): the red blood cell test for the estimation of acute eye irritation potentials. Present status. *Toxicol. in vitro* 13:343-354.

Parris, C. N. ; Masters, J. R. W.; Walker, M. C. Newman, B. Riddle, P. & English, P. (1987). Intravesical chemotherapy - combination with Tween 80 increases cytotoxicity in vitro. *Urol. Res.* 15:17-20.

Partearroyo, M. A.; Urbaneja, M. A. & Goñi, F. M. (1992). Effective detergent/lipid ratios in the solubilization of phosphatidylcholine vesicles by Triton X-100. *FEBS. Lett.* 302:138-140.

Patra, S. K.; Alonso, A. & Goñi, F. M. (1998). Detergent solubilization of phospholipid bilayers in the gel state: the role of polar and hydrophobic forces. *Biochim. Biophys. Acta* 1373:112-118.

Petrunyaka, V. V. & Severina, E. P. (1992). Effects of freezing and thawing, saponin and detergents on calcium-ATPase activity and erythrocyte membrane structure. *Biol. Memb.* 9:263-272.

Peuchant, E.; Delmasbeauvieux, M. C.; Dubourg, L.; Thomas, M. J.; Perromant, A.; Aparicio, M.; Clerc, M. & Combe, C. (1997). Antioxidant effects of a supplemented very low protein diet in chronic renal failure. *Free Rad. Biol. Med.* 22:313-320.

Platt, O. S. ; Lux, S. E. & Falcone, J. F. (1993). A highly conserved region of human erythrocyte ankyrin contains the capacity to bind spectrin. *J. Biol. Chem.* 268:24421-24426.

Platt, O. S. & Falcone, J. F. (1995). membrane-protein interactions in sickle red-blood-cells - evidence of abnormal protein-3 function. *Blood* 86:1992-1998.

Porter, M. R. (1991). In: *Handbook of surfactants*; Chapman & Hall, New York.

Pratt, R. S. & Cook, G. M. W. (1979). Solubilization of human erythrocyte membrane glycoproteins by Triton X-100. *Biochem. J.* 179:299-303.

Przestalski, S.; Hladyszowski, J.; Kuczera, J.; Rozycka-Roszak, B.; Trela, Z.; Chojnacki, H.; Witek, S. & Fisicaro, E. (1996). Interaction between model membranes and a new class of surfactants with antioxidant function. *Biophys. J.* 70:2203-2211.

Puppo, A. & Halliwell, B. (1988). Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. *Biochem. J.* 249:185-190.

Rahaman, S. O.; Mukherjee, J.; Chakrabarti, A. & Pal, S. (1998). Decreased membrane permeability in a polymyxin B-resistant *Escherichia coli* mutant

exhibiting multiple resistance to β -lactams as well as aminoglycosides. *FEMS Microb. Lett.* 161:249-254.

Ramalingam, K. & Bello, J. (1992). Effect of permethylation on the haemolytic activity of melittin. *Biochem. J.* 284:663-665.

Ramos, L. S. (1991). Interação de detergentes não-iônicos com a membrana eritrocitária: Estudo sobre a ação dos detergentes da série Tween. Tese de Mestrado, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas.

Requero, M. A.; Goñi, F. M.; Alonso, A. (1995). The membrane-perturbing properties of Palmitoyl-coenzyme A and Palmitoylcarnitine - a comparative study, *Biochemistry* 34: 10400-10405.

Requero, M. A.; Gonzalez, M.; Goñi, F. M.; Alonso, A. & Fidelio, G. (1995). Differential penetration of fatty acyl-coenzyme A and fatty acylcarnitines into phospholipid monolayers. *FEBS Lett.* 357:75-78.

Restaino, L.; Frampton, E. W.; Bluestein, R. L.; Hemphill, J. B. & Regutti, R. R. (1994). Antimicrobial efficacy of a organic acid anionic surfactant against various bacterial strains. *J. Food Prot.* 57:496-501.

Ribas, A. M. (1997) Estudo da Estabilidade de Bicamadas Lipídicas em Presença e Tensoativos. Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas.

Riechers, D. E.; Wax, L. M.; Liebl, R. A. & Bush, D. R. (1994). Surfactant-increased glyphosate uptake into plasma-membrane vesicles isolated from common lambsquarters leaves. *Plant. Physiol.* 105:1419-1425.

Riggs, A. (1981). Preparation of blood hemoglobin of vertebrates. *Meth. Enzymol.* 76:5-29.

Righetti, P. G.; Bossi, A.; Olivieri, E. & Gelfi, C. (1999). Capillary electrophoresis of peptides and proteins in acidic, isoelectric buffers: recent developments. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 40:1-15.

Samaha, M. W. & Gadalla, M. A. F. (1987). Solubilization of carbamazepin by different classes of nonionic surfactants and a bile-salt. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 13:93-112.

- Santana, M. H. A.; Carbonell, R. G. & Kilpatrick, P. K. (1993). Surface modified liposomes in the presence of nonionic surfactants. *Relatório científico da Fapesp*.
- Scherier, S. L. (1985). Red cell membrane biology. Introduction. *Clin. Haematol.* 14:1-12.
- Schrier, S. L.; Zachowski, A. & Devaux, P. F. (1992). Mechanisms of amphipath-induced stomatocytosis in human erythrocytes. *Blood* 79:782-786.
- Schreier, S.; Malheiros, S. V. P. & De Paula, E. (2000). Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects. *Biochim. Biophys. Acta* (no prelo).
- Schick, M. J. (1987). *Nonionic Surfactants - Physical Chemistry. Surfactant Science Series.* Marcel Dekker, New York, vol. 23.
- Schneider, R. G. (1980). Review of Hemoglobin-Variants Studied In Southwestern Usa. *Hemoglobin.* 4:363-371.
- Schroit, A. J. & Zwall, R. F. A. (1991). Transbilayer movement of phospholipids in red-cell and platelet membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1071:313-329.
- Seeman, P. & Weinstein J. (1966). I. Erythrocyte membrane stabilization by tranquilizers and antihistamines. *Biochem. Pharmacol.* 15:1737-1752.
- Seeman, P.; Shaáfi, R. I.; Galey, W. R. & Solomon, A. K. (1970). The effect of anesthetics (Chlorpromazine, ethanol) on erythrocyte permeability to water. *Biochim. Biophys. Acta* 211:365-368.
- Seeman, P. (1972). The membrane actions of Anesthetics and Tranquilizers, *Pharmacol. Rev.* 24: 583-655.
- Shaked, Z. ; Stewart, T. ; Thomson, J. ; Thomson, J. W. ; Taforo, T. & Hershenson, S. (1988). *Eur. Pat. Appl.* 13:270:799.
- Singer, S. J. & Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175:720-731.
- Storch, J. & Kleinfeld, A.M. (1985). The lipid structure of biological membranes. *Trends Biochem. Sci.* 10:418-421.

Streichman, S.; Kahana, E. & Silver, B. L. (1991). EPR study of hydrophobic interaction of spectrin with fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta* 1066:9-13.

Sun, Y.; Gu, L.; Tong, D.; Bai, S.; Ichikawa, S. & Furusaki, S. (1999). Protein separation using affinity-based reversed micelles. *Biotechnol. Progr.* 15:506-512.

Tagesson, C. & Edling, C. (1985). Influence of surface-active food-additives on the integrity and permeability of rat intestinal-mucosa. *Food Chem. Toxicol.* 22:861-864.

Tanford, C. (1980). *The hydrophobic effect: formation of micelles & biological membranes*, 2nd ed., John Wiley & Sons, New York.

Taniguchi, K.; Itakura, K.; Morisaki, K. & Hayashi, S. I. (1988). Effect of Tween 80 and liposomes on the corneal permeability of antiinflammatory steroids. *J. Pharmacobio-Dynam.* 11:685-693.

Thornalley, P. J. (1983). A mechanism for primaquine mediated oxidation of NADPH in red blood cells. *Biochem. Pharmacol.* 32:3571-3575.

Togo, T.; Alderton, J. M.; Bi, G. Q. & Steinhardt, R. A. (1999). The mechanism of facilitated cell membrane resealing. *J. Cell. Sci.* 112:719-731.

Torchilin, V. P. (1998). Polymer-coated long-circulating microparticulate pharmaceuticals. *J. Microencapsul.* 15:1-19.

Trägner, D. & Csordas, A. (1987). Biphasic interaction of Triton detergents with the erythrocyte membrane. *Biochem. J.* 244:605-609.

Uchegbu, I. F. & Vyas, S. P. (1998). Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) in drug delivery. *Int. J. Pharm.* 172:33-70.

Van Den Berg, J. J. M.; Kuypers, F. A.; Lubin, B. H.; Roelofsen, B. & Op Den Kamp, J. A. F. (1991). Direct and continuous measurement of hydroperoxide-induced oxidative stress on the membrane of intact erythrocytes. *Free Rad. Biol. Med.* 11:255-261.

Vasilescu, M.; Angelescu, D.; Almgren, M. & Valstar, A. (1999). Interactions of globular proteins with surfactants studied with fluorescence probe methods. *Langmuir* 15:2635-2643.

Viguera, A. R.; Mencia, M. & Goñi, F. M. (1993). Time-resolved and equilibrium measurements of the effects of poly(ethylene glycol) on small unilamellar phospholipid vesicles. *Biochemistry* 32:3708-3713.

Viguera, A. R. ; Gonzalez, M. J. M. ; Taneva, S. & Goñi, F. M. (1994). Early and delayed stages in the solubilization of purple membrane by a polyoxyethylenic surfactant. *Biochim. Biophys. Acta* 1196:75-80.

Voet, D. & Voet, J. G. (1990). Lipids and membranes. In: *Biochemistry*, John Wiley & Sons Inc., New York, 294.

Vyas, S. P.; Jaitely, V. & Kanaujia, P. (1997). Self-assembling supramolecular biovectors: A new dimension in novel drug delivery systems. *Pharmazie* 52:259-267.

Watanabe, T.; Kitabatare, N. & Doi, E. (1988). Protective effects of non-ionic surfactants against denaturation of rabbit skeletal myosin by freezing and thawing. *Agric. Biol. Chem.* 52:2517-2523.

Weber, K. & Osborn, M. (1969). Reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244:4406-&

Weisz, P. B.; Kumor, K. & Macarak, E. J. (1993). Protection of erythrocytes against hemolytic agents by cyclodextrin polysulfate. *Biochem. Pharmacol.* 45:1011-1016.

Weltzien, H. U. (1979). Cytolytic and membrane-perturbing properties of lysophosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta* 559:259-287.

Wennerstrom, H. & Lindman, B. (1979). Water penetration into surfactants micelles. *J. Phys. Chem.* 22:2931-2932.

Wilson, M. J.; Richter-Lownwy K & Daleke D. L. (1993). Hyperglycemia induces a loss of phospholipid asymmetry in human erythrocytes. *Biochemistry* 32:11302-11310.

Winterbourn, C. C. (1995). Toxicity of iron and hydrogen peroxide: The Fenton reaction. *Toxicol. Lett.* 82:969-974.

Winterbourn, C. C. & Metodiewa, D. (1999). Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. *Free Rad. Biol. Med.* 27:322-328.

Wong, R. K. M.; Nichol, C. P.; Sekar, M. C. & Roufogalis, B. D. (1987). The efficiency of various detergents for extraction and stabilization of acetylcholinesterase from bovine erythrocytes. *Biochem. Cell Biol.* 65:8-18.

Xu, R. J.; Vidal-Madjar, C. & Sébille, B. (1998). Capillary electrophoretic behavior of milk proteins in the presence of non-ionic surfactants. *J. Chromatogr. B.* 706:3-11.

Yokoyama, M.; Okano, T.; Sakurai, Y.; Ekimoto, H.; Shibazaki, C.; Kataoka, K. (1991). Toxicity and antitumor-activity against solid tumors of micelle-forming polymeric anticancer drug and its extremely long circulation in blood. *Cancer Res.* 51:3229-3236.

Yoon, K. A. & Burgess, D. J. (1996). Effect of nonionic surfactant on transport of model drugs in emulsions. *Pharm. Res.* 13:433-439.

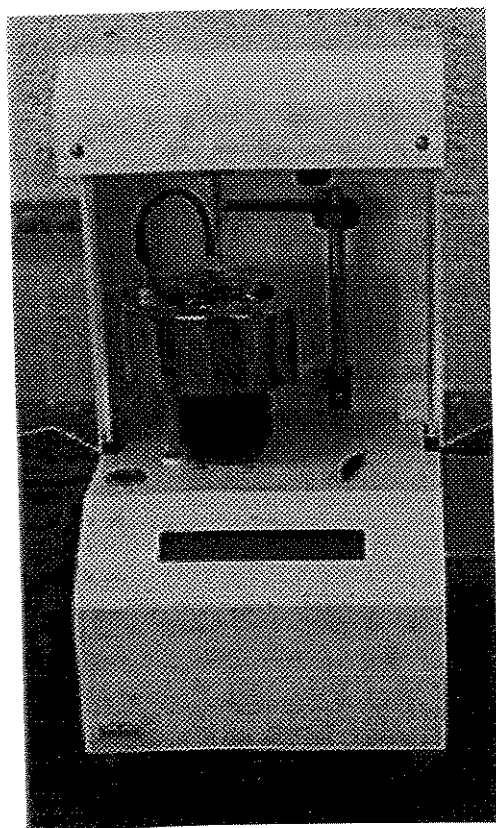
Zine, A. & Schweitzer, L. (1997). Localization of protein associated with the outer hair cell plasma membrane in the gerbil cochlea. *Neurosc.* 80:1247-1254

Ziouzenkova, O.; Asatryan, L. & Sevanian, A. (1999). Oxidative stress resulting from hemolysis and formation of catalytically active hemoglobin: protective strategies. *Int. J. Clin. Pharm. Th.* 37:125-132.

7 ANEXOS

A figura 36 mostra o tensiômetro do tipo Kruss K12 (pertencente ao Laboratório de Propriedades Coloidais e Reológicas, coordenado pelo Prof. Cesar Santana, Faculdade de Engenharia Química/Unicamp), utilizado nas medidas de tensões superficiais para a determinação da CMC dos surfactantes (item 3.2.3).

A)



B)

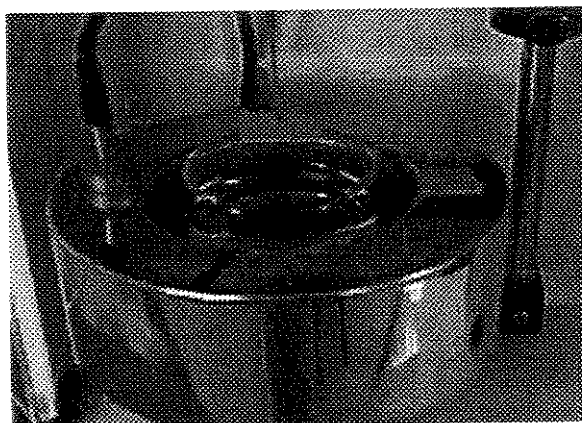


Figura 36 - Tensiômetro do tipo Kruss K12 (A) e detalhe da cavidade de medida (B).