



UNICAMP



# UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA - INSTITUTO DE BIOLOGIA

## Propriedades Físico-Químicas e Interação com Membranas Biológicas dos Surfatantes Não-Iônicos da Série Renex (nonilfenol etoxilado)

EDUARDO GALEMBECK

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato a) *Eduardo Galembeck* e aprovada pela Comissão Julgadora. *7/2/96 x*

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de Bioquímica

ORIENTADORA:  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> NILCE C. MEIRELLES

CAMPINAS  
1996

G131p

27048/BC



|          |  |
|----------|--|
| DADE     | BC   |
| CHAMADA: | UNICAMP  |
|          | 131 P  |
|          | Ex.  |
| IBO BC   | 27048  |
| C.       | 667196   |
|          | <input type="checkbox"/> D <input checked="" type="checkbox"/> |
| CO       | 2811,00  |
| A        | 2003/96  |
| CPD      |  |

4-00085601-9

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

GI3lp Galembeck, Eduardo  
Propriedades físico-químicas e interação com membranas biológicas dos surfatantes não-iônicos da série Renex (nonilfenol etoxilado) / Eduardo Galembeck. -- Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador: Nilce C. Meirelles.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Membranas (Biologia). 2. Detergentes. 3. Ressonância paramagnética eletrônica. I. Meirelles, Nilce Correa. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

LOCAL E DATA: Campinas, 7 de Fevereiro de 1995

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> NILCE C. MEIRELLES (Orientadora)

  
-----  
Assinatura

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> LÚCIA PEREIRA DA SILVA

  
-----  
Assinatura

Prof. Dr. WATSON LOH

  
-----  
Assinatura

SUPLENTE:

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> ENEIDA DePAULA

-----  
Assinatura

Do meu pai,  
minha mãe e  
meus irmãos.

## AGRADECIMENTOS

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Nilce C. Meirelles - orientadora e amiga.

Ao Prof. Dr. Fernando Galembeck - Pai.

Ao Prof. Dr. Antônio Alonso - experimentos de EPR.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eneida dePaula - sugestões, críticas e discussões.

Ao Prof. Dr. Arício X. Linhares - análises estatísticas.

À Sr.<sup>a</sup> Daysy de F. Scarparo de Sanctis - amostras de Renex.

Aos membros da pré-banca.

Ao pessoal do laboratório, em especial: Alessandro, Mariza e Sônia.

Ao pessoal das secretarias, em especial: Andréia e Marina.

Aos colegas do departamento.

Aos Amigos.

# ÍNDICE

|  |            |
|--|------------|
| <b>ABREVIATURAS.....</b>   | <b>iii</b> |
| <b>RESUMO.....</b>   | <b>iv</b>  |
| <b>ABSTRACT.....</b>   | <b>vi</b>  |
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>8</b>   |
| 1.1 SURFATANTES .....  | 8          |
| 1.2 CLASSIFICAÇÃO DOS SURFATANTES.....                               | 8          |
| 1.3 MECANISMO DE AÇÃO .....  | 10         |
| 1.4 MÍCELAS .....  | 12         |
| 1.5 SURFATANTES NÃO-IÔNICOS.....                                     | 15         |
| 1.6 A SÉRIE RENEX: AÇÃO SURFATANTE .....                             | 17         |
| 1.7 USOS DOS SURFATANTES .....                                       | 19         |
| 1.8 SURFATANTES NO ESTUDO DE BIOMEMBRANAS .....                      | 20         |
| <b>2. OBJETIVOS.....</b>   | <b>21</b>  |
| <b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                                   | <b>22</b>  |
| 3.1 FUNDAMENTO DE ALGUMAS TÉCNICAS UTILIZADAS.....                   | 22         |
| 3.1.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....                       | 22         |
| 3.1.2 Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE).....                | 24         |
| 3.2 SURFATANTES UTILIZADOS.....                                      | 28         |
| 3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS SURFATANTES.....                              | 29         |
| 3.3.1 Grau de Pureza .....   | 29         |
| 3.3.1.1 Ressonância magnética nuclear (RMN) .....                    | 29         |
| 3.3.1.2 Infra vermelho (IV) .....                                    | 30         |
| 3.3.2 Determinação de auto-oxidação.....                             | 31         |
| 3.3.3 Determinação da CMC.....                                       | 31         |
| 3.3.3.1 Espectroscopia de fluorescência .....                        | 32         |
| 3.3.3.2 Ressonância paramagnética eletrônica.....                    | 33         |
| 3.3.4 Determinação da fluidez das micelas formadas .....             | 34         |
| 3.4 INTERAÇÃO DOS SURFATANTES COM MEMBRANAS BIOLÓGICAS.....          | 35         |
| 3.4.1 Ensaio de hemólise.....  | 35         |
| 3.4.2 Alteração da fluidez das membranas de eritrócitos humanos..... | 36         |
| <b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                | <b>39</b>  |

---

|  |           |
|--|-----------|
| <b>4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS SURFATANTES .....</b>  | <b>39</b> |
| <b>4.1.1 Grau de Pureza .....</b>  | <b>39</b> |
| 4.1.1.1 Ressonância Magnética Nuclear .....  | 39        |
| 4.1.1.2 Infra Vermelho.....  | 44        |
| <b>4.1.2 Determinação de auto-oxidação dos estoques de surfatantes.....</b>                            | <b>47</b> |
| <b>4.1.3 Determinação da CMC.....</b>  | <b>47</b> |
| 4.1.3.1 Fluorescência.....   | 47        |
| 4.1.3.2 Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) .....   | 50        |
| <b>4.1.4 Determinação da fluidez das micelas.....</b>  | <b>57</b> |
| <b>4.2 INTERAÇÃO DOS SURFATANTES COM MEMBRANAS BIOLÓGICAS.....</b>                                     | <b>60</b> |
| 4.2.1 Teste hemolítico .....   | 60        |
| 4.2.2 Alteração da fluidez das membranas de eritrócitos causada pelos surfatantes da série Renex. .... | 63        |
| <b>4.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>  | <b>75</b> |
| <b>5. CONCLUSÕES .....</b>   | <b>78</b> |
| <b>6. BIBLIOGRAFIA.....</b>  | <b>79</b> |

**ABREVIATURAS**

|                |  |
|----------------|--|
| A              | absorbância                                      |
| ANS            | ácido 8-anilino-1-naftaleno sulfônico            |
| CMC            | concentração micelar crítica                     |
| E              | Polióxido de Etileno                             |
| HLB            | balanço hidrofílico lipofílico                   |
| If             | intensidade do sinal do marcador (RPE) livre     |
| Im             | intensidade do sinal do marcador (RPE) na micela |
| IV             | infra vermelho                                   |
| NP             | nonilfenol                                       |
| OE             | óxido de etileno                                 |
| PBS            | solução salina em tampão fosfato                 |
| PM             | peso molecular                                   |
| POE            | polióxido de etileno                             |
| RMN            | ressonância magnética nuclear                    |
| RPE            | ressonância paramagnética eletrônica             |
| S              | parâmetro de ordem                               |
| SAS            | software de análise estatística                  |
| T              | transmitância                                    |
| $T' \perp$     | desdobramento hiperfino perpendicular            |
| $T' //$        | desdobramento hiperfino paralelo                 |
| $\lambda_{EM}$ | comprimento de onda de emissão de fluorescência  |
| $\lambda_{EX}$ | comprimento de onda de excitação do fluoróforo   |



## Resumo

Muitos surfatantes apresentam efeitos sobre a membrana de hemáceas, bem conhecidos na literatura e dependentes da concentração: em concentrações elevadas surfatantes são hemolíticos, mas em concentrações baixas protegem a membrana. Cada efeito depende do tipo de interação do surfatante com a membrana, da ocorrência ou não de ligação entre ambos e das modificações que o surfatante introduz na membrana. Tem sido verificado que as características e consequências da interação do surfatante com a membrana dependem da estrutura desse: características da parte polar e da parte apolar, presença ou não de cargas, natureza dos grupos presentes na estrutura.

No presente trabalho, foi realizado o estudo dos efeitos da interação da membrana eritrocitária com uma família de surfatantes bastante conhecida e utilizada em meios biológicos, a dos nonilfenóis etoxilados, considerando-se também moléculas que apresentam um alto grau de etoxilação. Para isso foram utilizados os surfatantes Renex (nome comercial da série dos nonilfenóis etoxilados utilizada) 95, 200 e 1000, contendo uma média de 9,5, 20 e 100 moles de óxido de etileno por mol de nonilfenol, respectivamente.

A caracterização dos surfatantes foi feita através dos seus espectros de RMN e IV, que confirmaram a composição e o número de moles de óxido de etileno por mol de nonilfenol das amostras estudadas.

Foram realizados experimentos para a determinação de propriedades físico-químicas dos surfatantes da série Renex relevantes para as alterações funcionais da membrana eritrocitária: i) a CMC, que diz respeito à formação de micelas, foi determinada por espectroscopia de fluorescência e RPE; ii) o parâmetro de ordem do marcador de spin, em micelas, que informa sobre a fluidez da fase micelar, foi determinado por RPE. O Renex 95 mostrou a menor CMC (0,075 mM) e uma micela menos fluida que o Renex 200, que por sua vez mostrou uma CMC menor (0,11 mM) e uma micela menos fluida que o Renex 1000 (CMC = 0,75 mM).

Em uma segunda fase, foram feitos experimentos para a determinação dos efeitos de surfatante sobre a hemólise em meio hiposmótico de eritrócitos humanos integros. Foi também determinada a capacidade de solubilização de fosfolipídios das membranas eritrocitárias (ghosts) em soluções de surfatantes. O Renex 95 apresentou tanto a propriedade de hemolisar os eritrócitos como de solubilizar sua membrana. O Renex 200 não é hemolítico nem tem a capacidade de solubilizar a membrana. O Renex 1000, além de não apresentar propriedade hemolítica, mostrou ser um eficiente agente protetor da membrana contra a hemólise e também não apresentou capacidade de solubilizar a membrana.

Os fatos observados no presente trabalho sugerem que surfatantes com cadeia longa de polioxido de etileno, além de apresentarem uma menor penetração das cabeças polares na membrana, impedindo assim que essas sejam solubilizadas, formam uma capa hidrofílica externa à célula que estabiliza a pressão osmótica externa á membrana e a protege da hemólise hiposmótica.

## Abstract

Concentration-dependent surfactant effects on erythrocyte membranes are well-known, in the literature: high concentrations are haemolytic but low concentrations are often protective. These effects will depend on the pattern of surfactant interaction with the membrane, on surfactant-membrane binding and on its consequences, which in turn depend on surfactant structural characteristics: nature and sizes of polar and apolar groups as well as the presence (or not) of charges.

This is a study on the effects of a well-known surfactant family, widely used in biological studies, on the erythrocyte membrane. Surfactants used are ethoxylated nonylphenols, including two compounds with a high degree of ethoxylation. Renex brand (types 95, 200 and 1000) surfactants were used, with an average 9.5, 20 and 100 ethylene oxide residues per mol of phenol, respectively.

Surfactant characterization was done by NMR and IR spectroscopies, which confirmed the stated composition and the average number of ethylene oxide residues per molecule.

Two physico-chemical properties of Renex surfactants were determined, relevant for their interactions with membranes: i) critical micelle concentrations were determined by fluorimetry and by ESR; ii) spin-label order parameter within micelles were determined by ESR, and give information regarding micelle apolar medium fluidity. Renex 95 has the lowest cmc (0.075 mM) and its micelles are the least fluid. The cmc's of Renex 200 and 1000 are 0.11 and 0.75 mM respectively, and Renex 1000 micelle is the most fluid.

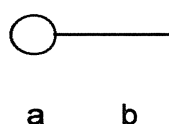
Two other types of experiments were performed: i) surfactant effect on whole erythrocyte membrane within hyposmotic media was determined; ii) membrane ghost phospholipid solubilisation in surfactant solutions was evaluated. Renex 95 is haemolytic (at higher concentrations) and solubilizes phospholipids. On the other hand, Renex 1000 protects the cell against haemolysis and does not show the ability to solubilize the membrane.

The facts reported in this thesis are consistent with the following model: the membranes are less penetrated by the apolar chains from the surfactants carrying the larger polar ends. Beyond that, the polar groups of the surfactant molecules are anchored to the membranes, and create a high-osmotic pressure coating outside the erythrocytes, which buffers the osmotic shock when the cells are introduced in the hyposmotic medium.

# 1. Introdução

## 1.1 *Surfatantes*

Tensoativos ou surfatantes, são compostos que têm a propriedade de adsorver em uma interface ar - água ou óleo - água e à superfície de sólidos. Essa atividade interfacial é a responsável pelos fenômenos da ação superficial, micelização e solubilização, e é decorrente do fato das moléculas de surfatante possuírem uma porção hidrofílica ou polar e outra hidrofóbica ou apolar (Attwood & Florence, 1983). Moléculas que apresentam essa natureza dual são denominadas anfifílicas e são representadas esquematicamente da seguinte forma:



- a) Porção hidrofílica
- b) Porção hidrofóbica

## 1.2 *Classificação dos surfatantes*

Os surfatantes são classificados com base nas características e composição das suas porções polares e apolares.

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

A porção polar ou hidrofílica pode ser carregada positiva ou negativamente, caracterizando os surfatantes catiônicos ou aniônicos. Pode ainda ser formada por uma cadeia de polióxido de etileno (POE), o que ocorre na maioria dos surfatantes não-iônicos. O comportamento hidrofílico dos grupos iônicos deve ser atribuído em primeiro lugar à sua solvatação (por interação íon-dipolo com a água), e o comportamento hidrofílico dos grupos não-iônicos está relacionada à hidratação de tais grupos, através de pontes de hidrogênio.

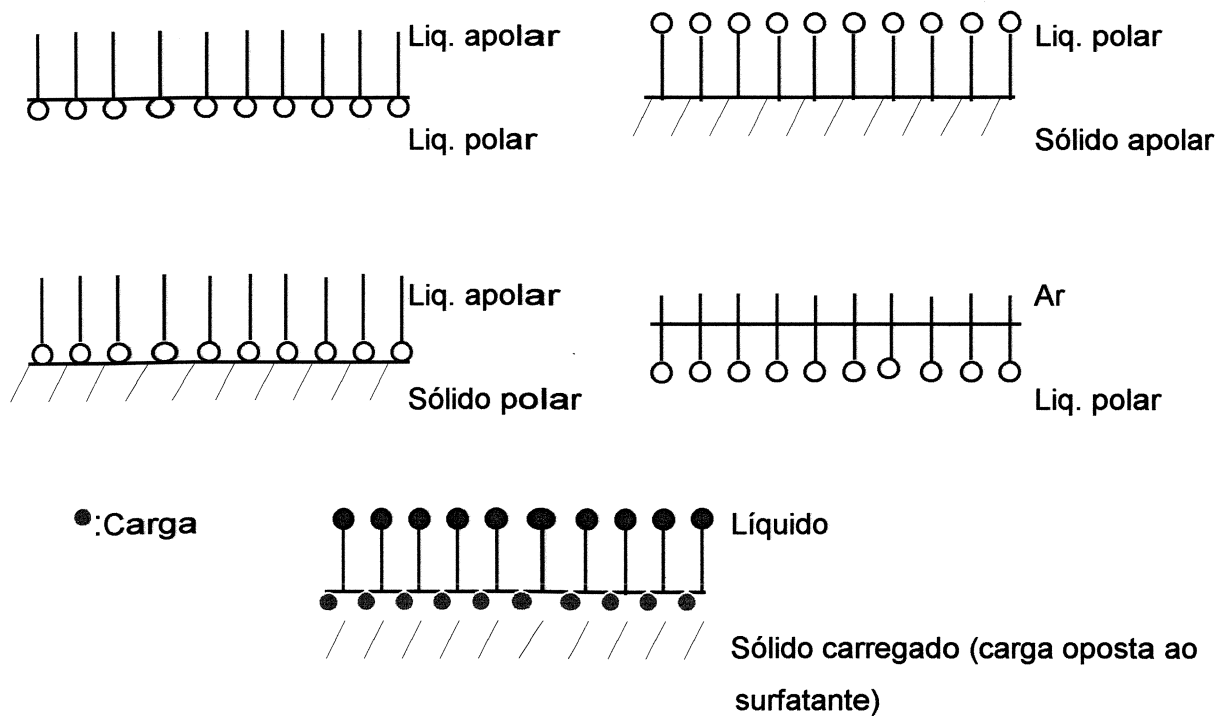
De acordo com grupos polares que os constituem, os surfatantes são geralmente classificados em:

- a) **Aniônicos**: quando dissociados em solução aquosa, apresentam carga negativa. Os principais são compostos carboxilados, sulfatados, sulfonados ou fosfatados. São utilizados em cosméticos, xampus, desinfetantes, lavanderias industriais, detergentes de uso doméstico, na indústria têxtil, e de papel. Ex. SDS, óleo de riceno.
  
- b) **Catiônicos**: quando dissociados em solução aquosa, apresentam carga positiva. São aminas primárias, secundárias ou terciárias, ou sais de amônio quaternário. São utilizados na indústria têxtil e de fertilizantes, no revestimento de estradas (asfalto), são também utilizados como amaciantes de roupas e condicionadores de cabelo. Ex. CTAB.

- c) **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 poli - hidroxílicos ou oligossacarídeos. São utilizados em xampus, cosméticos, defensivos agrícolas, tratamento de metais, indústria têxtil e de petróleo. Ex. nonilfenóis etoxilados (Renex), Tween e Triton.
- d) **Zwiteriônicos**: comportam-se como aniônicos ou como catiônicos, dependendo do pH do meio em que estão atuando. São, por exemplo, N - alquil derivados de amino - ácidos. São utilizados em produtos de higiene pessoal (sabonete líquido, xampus, géis ...), espuma para controle de incêndio, limpeza industrial e de automóveis. Ex. betaínas e sulfobetainas.

### **1.3 Mecanismo de Ação**

A principal característica dos surfatantes é que, quando em solução aquosa diluída, se apresentam em maior concentração na superfície do que no interior do líquido. Esse fenômeno conhecido como adsorção ocorre em interfaces líquido/sólido, líquido/líquido e líquido/ar (Porter, 1991). A Figura 1 ilustra algumas maneiras pelas quais as moléculas de surfatantes se orientam em diferentes interfaces.



**Figura 1. Orientação das moléculas de surfatantes adsorvidas a diferentes interfaces.**

O estudo da adsorção é importante para compreender as propriedades dos tensoativos pois esses provocam mudanças na energia livre da interface e carga da superfície, o que leva à sua capacidade de emulsificar, suspender ou solubilizar outras substâncias em água (Attwood & Florence, 1983), propriedades essas que podem ser afetadas por fatores como temperatura, pH, concentração e grau de pureza do tensoativo, presença de íons e de aditivos orgânicos (Shinagawa et al., 1993; Cardamone et al., 1994; Maulik et al., 1995).

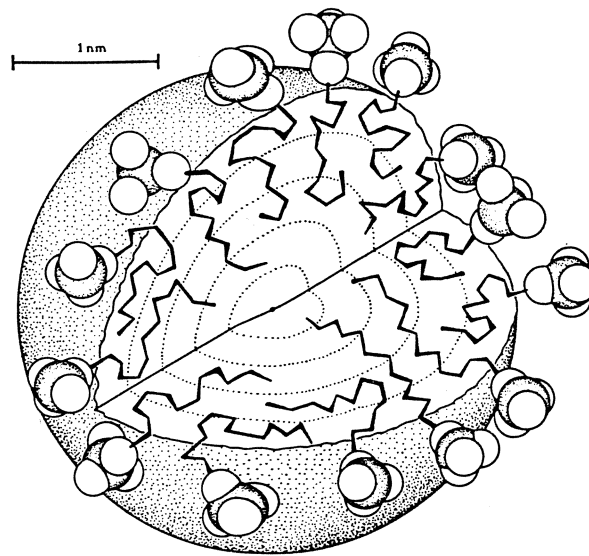


A natureza dual dos agentes tensoativos também lhes confere a capacidade de auto - agregação. Essas moléculas, em baixas concentrações, se apresentam na forma de monômeros, e a partir de uma determinada concentração, que varia de molécula para molécula, passa a ocorrer a formação de agregados que são denominados micelas (Schik, 1963; Mukerjee & Mysels, 1970; Neugebauer, 1994).

#### **1.4 Micelas**

Surfatantes em pequenas concentrações em solução tendem a adsorver na interface ar/água (Figura 1), onde se encontram em maior concentração do que no interior da solução, e provocam uma redução na tensão superficial. Se a concentração de surfatantes na solução for aumentada até que a porção adsorvida à superfície atinja uma determinada concentração, a tensão superficial se estabiliza tornando-se praticamente constante, independentemente do aumento na concentração do surfatante.

Um fator que limita a concentração de surfatante na superfície é a auto - associação das moléculas em solução, formando agregados denominados micelas, como esquematizado na Figura 2.



**Figura 2 Modelo proposto por Gruen para uma micela de SDS em água (Gruen, 1985).**

As micelas podem se apresentar na forma de esfera, disco ou cilindro. Em concentrações mais baixas, micelas são esféricas; micelas discóides ou cilíndricas são formadas em concentrações mais elevadas e as suas soluções apresentam características líquido - cristalinas, ou mesofásicas.

A menor concentração em que as micelas se formam é denominada de concentração micelar crítica (CMC), ou seja, a CMC corresponde à concentração máxima de monômeros livres de surfatante, em solução (Helenius et al., 1979; Mysels & Mukerjee, 1979; Neugebauer, 1994).

A formação de micelas pelas moléculas de surfatantes e portanto a CMC são influenciadas por uma série de fatores, que podem ser intrínsecos ou extrínsecos às moléculas, como por exemplo:

a) Fatores ligados à estrutura química do surfatante:

i) características da cadeia hidrofóbica

- a CMC diminui com o aumento do número de átomos de carbono. Ex.  $C_8E_6$ , CMC =  $9,9 \times 10^{-3}$  moles/l e  $C_{10}E_6$ , CMC =  $9,0 \times 10^{-3}$  moles/l (Helenius et al., 1979).
- a CMC diminui se átomos de flúor substituírem átomos de carbono no grupamento hidrofóbico. Ex. substituição de um  $CH_3$  terminal por um  $CF_3$  (Attwood & Florence, 1983).

ii) características da cadeia hidrofílica

- grupos hidrofílicos carregados possuem CMC maior que os não-iônicos etoxilados correspondentes (Porter, 1991);
- a adição de unidades de óxido de etileno nos não-iônicos acarreta um aumento na CMC. Ex.  $C_{16}E_9$  a CMC é  $2,1 \times 10^{-6}$  moles/l,  $C_{16}E_{21}$  a CMC é  $3,9 \times 10^{-6}$  moles/l (Helenius et al., 1979);

b) Influência da adição de eletrólitos

- i) a CMC diminui mediante a adição de eletrólitos a surfatantes iônicos. EX. CMC do SDS que é de  $8,1 \times 10^{-3}$  moles/l em água, com uma concentração de 0,03 moles/l de NaCl a CMC do SDS diminui para  $3,1 \times 10^{-3}$  moles/l e com uma concentração de 0,5 moles/l de NaCl a CMC do SDS cai para  $0,51 \times 10^{-3}$  moles/l (Helenius et al., 1979);

ii) a CMC dos surfatantes não-iônicos não é muito alterada pela adição de eletrólitos (Mukerjee & Mysels, 1970).

c) Efeito da temperatura

i) a CMC diminui com o aumento da temperatura, nos surfatantes não-iônicos. Ex. CMC do C<sub>10</sub>E<sub>5</sub> é  $1,4 \times 10^{-3}$  moles/l a 10 °C, e  $0,7 \times 10^{-3}$  moles/l a 40 °C (Attwood & Florence, 1983).

ii) a CMC aumenta com a temperatura, nos surfatantes iônicos. Ex. CMC do SDS é  $8,13 \times 10^{-3}$  moles/l a 25 °C, e  $9,8 \times 10^{-3}$  moles/l a 50 °C (Attwood & Florence, 1983).

d) Efeito do pH

i) a CMC dos surfatantes não-iônicos sofre pouca alteração com variação de pH.

ii) a CMC dos surfatantes iônicos sofre alteração com a variação do pH (Porter, 1991).

O tamanho das micelas aumenta e a CMC diminui com o aumento da região apolar, ou com a diminuição do tamanho e polaridade dos grupos hidrofílicos (Helenius et al., 1979).

### **1.5 Surfatantes não-iônicos**

Os surfatantes não-iônicos não se dissociam em água formando íons, e isso lhes confere certas vantagens sobre os surfatantes iônicos:

- a) Os surfatantes não-iônicos são compatíveis com todos os outros tipos de surfatantes, são normalmente usados como co-surfatantes. O sinergismo com os anionicos, principalmente, e formação de micelas mistas com outros surfatantes é muito utilizado com o propósito de diminuir a tensão interfacial, resultando um aumento da atividade surfatante. Já os catiônicos e aniônicos são frequentemente mutuamente incompatíveis (pois podem formar pares iônicos, com menos efeito superficial, ou podem precipitar).
- b) Os surfatantes não-iônicos geralmente têm suas propriedades pouco alteradas pelo pH e por adição de compostos iônicos em solução (Porter, 1991).

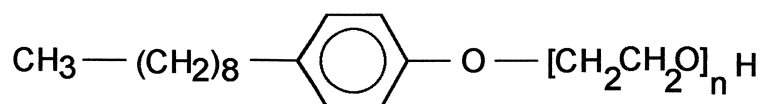
A anfipaticidade natural dos surfatantes não-iônicos pode ser expressa em termos de balanço entre as porções hidrofóbica e hidrofílica da molécula. Uma escala empírica de HLB (balanço lipofílico hidrofílico) foi proposta por Griffin (Attwood & Florence, 1983) e é usada para determinar o grau de afinidade do tensoativo em relação à água ou óleo. Griffin propôs o cálculo do HLB a partir da estrutura química da seguinte forma:  $HLB = \% \text{ do grupo hidrofílico (molar)} / 5$ . Dessa forma seu valor numérico varia de zero a vinte (100%), sendo que valores inferiores a nove caracterizam moléculas lipofílicas, e valores acima de onze caracterizam moléculas hidrofílicas. O HLB de misturas de surfatantes deve ser calculado através da média ponderada dos valores de HLB das moléculas dos surfatantes misturados. Quanto maior o HLB, maior a CMC dos surfatantes.

### 1.6 A série Renex: ação surfatante

A série Renex é composta por produtos definidos quimicamente como nonilfenóis polietoxilados e forma uma das mais importantes classes de surfatantes não-iônicos.

Os surfatantes da série Renex apresentam um grau de etoxilação (número médio de moles de óxido de etileno por mol de nonilfenol) que varia de 1,8 a 100 moles de óxido de etileno (OE).

A estrutura química do nonilfenol etoxilado pode ser representada assim:



onde n representa o número de moles de óxido de etileno por mol de nonilfenol (NP).

O caráter anfipático da molécula é consequência da presença do grupo hidrofóbico proveniente do nonilfenol e da cadeia hidrofílica de polióxido de etileno.

O grau de etoxilação do nonilfenol é determinante de certas características dos surfatantes dessa série. Quanto maior o número de unidades de óxido de etileno por molécula, maior será o HLB dessa molécula.

A Tabela I apresenta as especificações comerciais dos produtos de série Renex, fornecidas pelo fabricante.

**Tabela I Especificações comerciais dos produtos da série Renex<sup>1</sup>**

| Propriedade                                 | Tipo de Renex |        |        |
|---|---------------|--------|--------|
|   | 95            | 200    | 1000   |
| Estado físico a 25°C                        | Líquido       | Sólido | Sólido |
| Índice de hidroxila (mg KOH / g de produto) | 87-97         | 48-55  | 12-16  |
| Teor máximo de água (%)                     | 1             | 1      | 1      |
| pH  | 5-7,5         | 5-7,5  | 5-7,5  |
| Moles de OE por mol de NP (médio)           | 9,5           | 20     | 100    |

<sup>1</sup> Dados do fabricante (Oxiteno do Brasil)

### **1.7 Usos dos surfatantes**

Surfatantes são largamente empregados na indústria farmacêutica e de cosméticos, participando na formulação de grande parte dos produtos de higiene pessoal.

Na indústria farmacêutica, em particular, alguns agentes tensoativos despertam grande interesse por terem demonstrado ação bactericida, fungicida, sinergismo na ação de algumas drogas e capacidade de dissolver membranas virais, além da capacidade de solubilizar, suspender e emulsificar drogas, principalmente as hidrofóbicas (Helenius & Söderlund, 1973; Restaino et al., 1994; Bassetti et al., 1995; Brenner et al., 1995; Forney & Glatz, 1995).

Os surfatantes não-iônicos têm um papel especial na indústria farmacêutica por sofrerem pouca alteração causada por variação de pH (Attwood & Florence, 1983).

O surfatante da série Renex mais aplicado na indústria farmacêutica é o Renex 95, que além do uso como solubilizante é também um eficiente agente espermicida (McGroarty et al., 1994; Michel et al., 1994; Weir et al., 1994).



### **1.8 Surfatantes no estudo de biomembranas**

No estudo de biomembranas os surfatantes são muito utilizados no isolamento e estudo de proteínas membranares (Pratt et al., 1979;Loizaga et al., 1979; Bangham & Lea, 1978; Neugebauer, 1994), porém são também bastante utilizados em experimentos em que se necessita alterar a permeabilidade da membrana, para facilitar a transferência de solutos. A interação dos surfatantes com membranas biológicas é muito importante por ser uma das principais ferramentas para definir possíveis aplicações dessas moléculas na indústria farmacêutica. Vários autores têm investigado essa interação, no que diz respeito à hemólise. Isomaa (1986) estudou as alterações de permeabilidade, induzida por anfifílicos com diferentes comprimentos da cadeia alquil, em eritrócitos humanos. Tränger (1987) observou um efeito bifásico (hemólise e proteção) na interação dos surfatantes da série Triton com as membranas de eritrócito. Ohnishi (1993) estudou o efeito da estrutura de surfatantes não-iônicos com cadeia de polióxido de etileno em relação à hemólise.

Em nosso laboratório, Ramos (1991) demonstrou que a série Tween (surfatante não-iônico) apresenta comportamento bifásico em relação à lise de eritrócitos dependendo da concentração e da estrutura das cadeias laterais.

## **2. Objetivos**

Os objetivos do presente trabalho são:

1. Caracterização das propriedades físico - químicas dos surfatantes da série Renex que podem vir a causar alterações funcionais na membrana eritrocitária.
2. Determinação dos efeitos da interação surfatante/membrana sobre a hemólise hiposmótica em eritrócitos humanos.
3. Determinação da capacidade de solubilização das membranas eritrocitárias pelos surfatantes em meio isosmótico.

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1 *Fundamento de algumas técnicas utilizadas***

##### **3.1.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

A ressonância magnética nuclear (RMN) é fundamentada no fato de que os núcleos de muitos átomos têm associados a si um momento magnético. Quando submetidos a um campo magnético externo, este momento assume 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 esses níveis de energia, pela absorção de radiação. Essas mudanças de energia (absorção) são detectadas, digitalizadas e armazenadas por um espectrômetro de RMN. Em seguida, os sinais digitais são transformados para um domínio de frequência, utilizando transformada de Fourier. 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 et al., 1963; Derome, 1987).

O valor do campo magnético observado por um núcleo depende da estrutura eletrônica ao redor do mesmo; desta forma o núcleo do isótopo analisado, aqui usaremos como exemplo o próton  $^1\text{H}$ , absorve

energia a diferentes frequências quando em diferentes ambientes químicos. Em um composto, cada átomo de hidrogênio que estiver em um meio eletrônico diferente produzirá um pico no espectro de ressonância magnética nuclear. A diferença entre a frequência de um próton isolado em um composto padrão (tetrametilsilano), tido como ponto de referência, e outro próton em um dado ambiente é definida como deslocamento químico. O deslocamento químico pode ser expresso em frequência - Hz, ou, mais comumente em ppm em relação à frequência, em Hz, do espectrômetro usado. Isso permite a comparação entre valores de deslocamento adquiridos em diferentes resoluções (Derome, 1987).

O deslocamento químico e a constante de acoplamento (a quebra do sinal de um único núcleo ou de um grupo de núcleos em mais de um pico), oferecem informações estruturais qualitativas sobre a molécula. Medidas quantitativas podem ser feitas comparativamente utilizando-se a intensidade do sinal ou ainda a 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).

Neste trabalho, essa técnica foi empregada para caracterizar as amostras de surfatantes utilizados, particularmente quanto à relação nonilfenol/polióxido de etileno.

As medidas de RMN foram feitas em um espectrômetro da marca Bruker, operando a 300 MHz, pertencente ao Instituto de Química da UNICAMP.

### **3.1.2 Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)**

A ressonância paramagnética eletrônica (RPE) é uma técnica espectroscópica que detecta compostos com elétrons desemparelhados. A maioria das moléculas têm todos os elétrons pareados e apenas algumas contêm elétrons desemparelhados. Essas moléculas com elétrons desemparelhados (moléculas paramagnéticas), quando submetidas a um campo magnético, orientam-se segundo seus momentos magnéticos de spin. Quando se aplica uma onda eletromagnética ressonante com a precessão desse spin eletrônico, ocorre absorção de energia, que é registrada no espectro de RPE como as primeiras derivadas das bandas de absorção de energia da amostra.

As informações mais importantes dos espectros de RPE estão no desdobramento hiperfino, isto é, a quebra em componentes individuais das linhas de ressonância. O desdobramento hiperfino é originado pela interação entre o spin eletrônico e o momento magnético dipolar de um núcleo próximo ao elétron desemparelhado.

A técnica do marcador de spin, consiste na utilização de uma

molécula paramagnética como marcador (Hubbel & McDonnell, 1976). Através do espectro de RPE da molécula usada como marcador é possível obter-se informação de caráter estrutural a respeito do sistema ao qual o marcador se encontra ligado. O espectro de RPE é ainda sensível à mobilidade (tempo de correlação rotacional) do marcador no meio em que se encontra. Informações sobre a dinâmica do marcador em água e em micelas ou membranas podem ser usadas para determinar a CMC de surfatantes.

A partir dos espectros de RPE, também é possível calcular o parâmetro de ordem ( $S$ ), que é uma medida da anisotropia do ambiente em que se encontram as moléculas do marcador de spin. Quanto mais próximo da unidade for o valor de  $S$ , mais anisotrópica estará a molécula, o que significa que o meio em que ela se encontra está menos fluido. Em um meio de alta fluidez a molécula do marcador de spin pode girar rapidamente em torno de seus eixos, quando resulta um espectro de linhas mais finas e mais simétrico, do qual se calcula um menor valor de  $S$ .

Para o cálculo do parâmetro de ordem ( $S$ ), item 3.3.4, foram utilizadas as medidas dos desdobramentos hiperfino paralelo e perpendicular aparentes, observados nos espectros, e feita uma correção empírica dos desdobramentos aparentes em relação aos desdobramentos em cristais (Griffith, 1976). Essa correção deve ser feita, pois os desdobramentos hiperfinos verdadeiros só são medidos quando a molécula paramagnética se encontra incluída em cristais, o

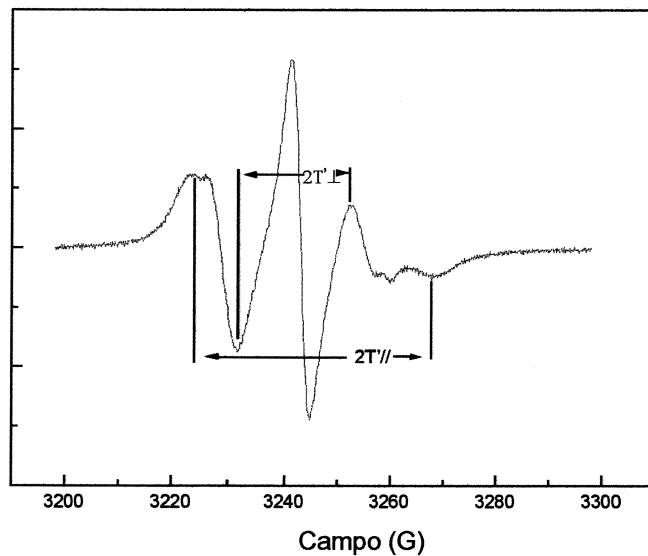
que não reflete a realidade biológica. Para o cálculo do S, portanto, foi utilizada a seguinte equação:

$$S = \frac{T'_{//} - T'_{\perp} - C}{T'_{//} + 2T'_{\perp} + 2C} \times 1,723$$

onde  $C = 1,4 - 0,053 (T'_{//} - T'_{\perp})$

$T'_{//}$  e  $T'_{\perp}$  representam, respectivamente, os desdobramentos hiperfino paralelo e perpendicular aparente dos espectros (Figura 3).

C é uma correção empírica dos desdobramentos hiperfino paralelo e perpendicular aparentes, em relação aos observados em cristais (Griffith, 1976).



**Figura 3. Espectro de RPE do marcador ácido 5-DOXIL esteárico (0.05 mM) em micelas de Renex 200 (20 mM), tampão fosfato 0,5mM, pH 7,4, 25°C.**

No presente trabalho, a técnica de RPE foi empregada com o uso do marcador, ácido esteárico 5-DOXIL, para monitorar a formação de agregados de surfatantes e a fluidez desses agregados, bem como a das membranas incubadas com os surfatantes.



Os espectros de RPE foram obtidos em um espectrômetro Varian E-9, equipado com a cavidade TE<sub>102</sub> e controlador de temperatura por fluxo de N<sub>2</sub>. As condições experimentais foram: potência de irradiação, 20 mW, campo central de 3250 G, varredura de 100 G, frequência de microonda de 9,12 GHz e campo de modulação de 2,5 G. Equipamento pertencente ao Instituto de Física da UNICAMP.

### **3.2 Surfatantes utilizados**

Os surfatantes utilizados no presente trabalho foram doados pela Oxiteno do Brasil, e utilizados sem tratamentos prévio.

Para a execução do presente trabalho foram utilizados apenas os surfatantes solúveis em água, ou seja, com mais de nove moles de óxido de etileno (OE) por mol de nonilfenol, sendo selecionados os seguintes compostos: Renex 95, Renex 200 e Renex 1000, que apresentam uma média de 9,5, 20 e 100 moles de OE por mol de nonilfenol, respectivamente.

### **3.3 Caracterização dos surfatantes**

#### **3.3.1 Grau de Pureza**

##### **3.3.1.1 Ressonância magnética nuclear (RMN)**

Medidas de ressonância magnética nuclear de prótons  $^1\text{H}$  ( $^1\text{H}$  RMN) foram feitas para determinar o tamanho médio das cadeias alquilas, e de poli(óxido de etileno).

As amostras dos surfatantes foram previamente secas em dessecador com pentóxido de fósforo, pesadas a cada 24 horas, foram consideradas secas, quando seus pesos se mantiveram constantes, sendo então diluídas 1:9 (v/v) em água deuterada.

Para cada espectro obtido, os picos foram atribuídos aos grupamentos químicos, e em seguida foi calculada a quantidade de prótons de cada pico, tomando-se como referência 1/4 do valor da integral dos picos dos prótons fenólicos (4 prótons). Com base nesse valor foi calculado o número de prótons nos picos do grupamento nonil e óxido de etileno, dividindo-se o valor da integral desses picos pelo valor da referência (Greff & Flangan, 1963; Crutchfield et al., 1964; Sheih & Fendler, 1976).

### 3.3.1.2 *Infra vermelho (IV)*

Espectros de infra vermelho das amostras de surfatante foram obtidos com o objetivo de complementar os ensaios de RMN, permitindo também detecção de impurezas e a caracterização das estruturas dos surfatantes. Através dos espectros de IV obtve-se a relação  $A_{1350}/A_{1610}$  (Meszlényi et al., 1991), que é proporcional ao número de OE esperado. Ou seja,

$$c = OE / (A_{1350}/A_{1610})$$

onde  $c$  é a constante de correlação entre a parte hidrofóbica (nonilfenol) e hidrofílica (polióxido de etileno).

A obtenção dessa constante significa que o aumento da cadeia de OE observado em uma série de nonilfenóis etoxilados está de acordo com o esperado.

Os valores de absorbância ( $A$ ) foram calculados de acordo com a equação:

$$A = - \log T$$

Os valores de transmitância ( $T$ ) foram obtidos a partir do método da linha base nos picos 1350 e 1610  $\text{cm}^{-1}$ .

As medidas foram obtidas das amostras totais em janela de haletos alcalinos, em espectrômetro Perkin-Elmer, modelo 1600 FT-IR Series 40, pertencente ao Instituto de Química da UNICAMP.

### **3.3.2 Determinação de auto-oxidação**

A presença de peróxido nos estoques de surfatantes foi avaliada através do teste colorimétrico com iodeto de potássio (Merck Standards, 1972). Esse teste consiste em incubar a amostra de surfatante (20 mM, maior concentração de surfatante utilizada nos experimentos) com uma solução de iodeto de potássio (KI) 10% na proporção de 11:1 (v:v) durante uma hora a temperatura ambiente na ausência de luz. A presença de peróxido é determinada pelo aparecimento de coloração amarelada na solução, devido à oxidação do iodeto a iodo molecular, e foi monitorada pela absorvância da solução em 353 nm . Se a absorvância for menor que 0,01, significa que, caso exista peróxido, sua concentração é inferior a 0,005%.

### **3.3.3 Determinação da CMC**

Para a medida da CMC dos surfatantes estudados foram preparadas diferentes soluções de Renex com concentrações que variaram de 0,01 a 0,15 mM para o Renex 95; 0,01 a 0,29 mM para o Renex 200 e 0,1 a 1,5 mM para o Renex 1000. Essas concentrações

foram escolhidas por estarem próximas dos valores da CMC de cada surfatante, citado na literatura (Shönfeldt, 1972). Nessas soluções, a presença ou não de micelas foi detectada através de duas técnicas diferentes: espectroscopia de fluorescência (Mast & Haynes, 1975; Khuanga et al., 1976; De Vendittis et al., 1981) e ressonância paramagnética eletrônica usando o método do marcador de spin (Hubbel & McDonnell, 1976; Caldararu, 1992; 1994).

As soluções foram preparadas em tampão fosfato 0,5 mM, pH 7,4, e as leituras foram feitas a temperatura ambiente de  $25 \pm 1$  °C, em ambos os métodos.

### ***3.3.3.1 Espectroscopia de fluorescência***

No presente trabalho essa técnica foi utilizada para monitorar a fluorescência emitida por uma molécula hidrofóbica, que só fluoresce em meio apolar. Esse marcador foi utilizado para determinar a CMC dos surfatantes, pois as micelas apresentam uma região hidrofóbica, na qual o marcador de fluorescência se solubiliza e fluoresce, quando excitado pelo comprimento de onda adequado. A intensidade da fluorescência emitida é diretamente proporcional à quantidade de micelas no meio, pois quanto mais micelas existirem no meio, mais regiões apolares existirão para o marcador se ligar.

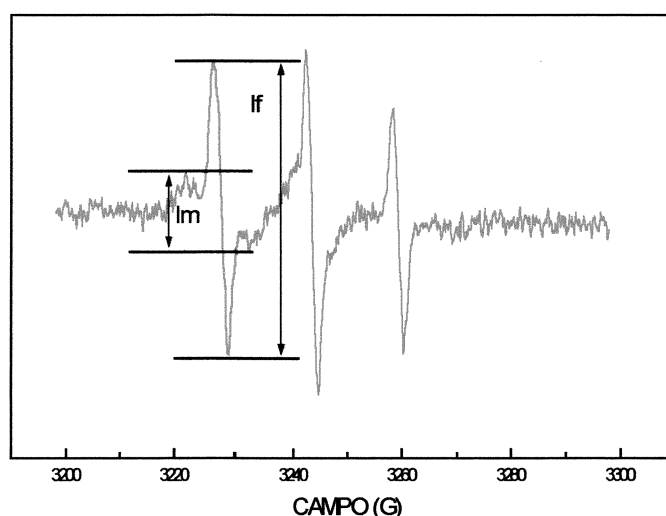
Para a determinação da CMC por fluorescência foi utilizado como sonda o ácido 8-anilino-1-naftaleno sulfônico (ANS) que só emite

fluorescência quando se encontra em meio apolar. Foi medida a emissão de fluorescência em 490 nm, sendo a excitação feita em 345 nm. Os valores de fluorescência foram plotados em função da concentração de surfatante, duas retas foram ajustadas aos pontos, e o ponto de interseção das duas retas obtidas foi tomado como a CMC. A concentração final de ANS nas amostras foi 20  $\mu\text{M}$  (Mast & Haynes, 1975; De Vendittis et al., 1981; VanAlstine et al., 1986).

Os experimentos de fluorescência foram feitos, utilizando-se um espectrofluorímetro SPF - 500 da marca SLM - AMINCO.

### ***3.3.3.2 Ressonância paramagnética eletrônica***

Para a determinação da CMC por RPE foi empregada a técnica do marcador de spin, utilizando-se o ácido 5-DOXIL esteárico como marcador. Foram obtidos os espectros do marcador em soluções aquosas dos surfatantes, através dos quais obteve-se os parâmetros  $I_f$  e  $I_m$ .  $I_f$  representa a intensidade do sinal no marcador livre na água e  $I_m$  a intensidade do sinal do marcador incorporado à micela (Figura 4). A CMC dos surfatantes foi calculada através da razão dos parâmetros  $I_m/I_f$ , plotada em função da concentração de surfatante. Duas retas foram ajustadas aos pontos, o ponto de interseção das duas retas foi tomado como a CMC. A concentração final de marcador de spin nas amostras foi de 0,01 mM. Os espectros das amostras foram obtidos a 25°C.



**Figura 4 Espectro de RPE do marcador ácido 5-DOXIL esteárico (0.01 mM) em solução aquosa de Renex 95 (0.09 mM), tampão fosfato 0,5 mM pH 7,4, 25°C.**

### **3.3.4 Determinação da fluidez das micelas formadas**

Espectros obtidos segundo o item anterior, porém a 37°C, foram medidos para cada surfatante, a 20 mM, foi tomada uma concentração elevada para se obter um sinal de RPE com o mínimo de ruído. Esses espectros apresentaram um sinal bem definido, sem a presença de marcador livre. Desses espectros obtiveram-se os parâmetros  $T'_{\perp}$  e  $T'_{\parallel}$ , definidos conforme a Figura 3. A partir deles, foi calculado o parâmetro de ordem (S) para cada surfatante. Esse parâmetro, S, varia de 0 (sistemas totalmente isotrópicos) a 1 (sistema totalmente anisotrópico). Assim, as micelas são consideradas menos ordenadas (mais fluidas) quanto menor o valor de S.

### **3.4 Interação dos surfatantes com membranas biológicas**

#### **3.4.1 Ensaio de hemólise**

Os testes hemolíticos foram efetuados em suspensões de hemácias preparadas a partir de sangue humano. O sangue (cerca de 20 mL por coleta) foi coletado em solução anticoagulante Alsilver (citrato de sódio - 8,0 g/L; ácido cítrico - 0,55 g/L; dextrose - 20,5 g/L e cloreto de sódio 4,2 g/L) na preparação 1:2 (v:v). Após a coleta do sangue foi feita uma centrifugação a 700 x g por 15 minutos para a separação do anticoagulante, plasma e leucócitos. As hemácias foram ressuspensas em solução salina em tampão fosfato (PBS) 5mM, pH 7,4 e centrifugadas a 700 x g por 10 minutos. A ressuspensão e centrifugação foram repetidas por três vezes, nas mesmas condições. Obteve-se um concentrado de hemácias que foi ressuspenso em PBS 5 mM, resultando uma concentração de hemácias de 2% (voluma/volume).

Alíquotas de 1 mL da suspensão de hemácias foram adicionadas a igual volume de solução de surfatante em tampão fosfato 5mM, pH 7,4, em concentrações que variaram de 0 (controle) a 10 mM.

As amostras foram incubadas por 15 minutos a temperatura de  $25 \pm 1$  °C, centrifugadas a 700 x g por 10 minutos, e as leituras de absorbância dos sobrenadantes foram feitas em um espectrofotômetro



Beckman DU 70 em 540 nm, a uma temperatura de  $25 \pm 1$  °C. A Absorbância em 540 nm é devido a oxihemoglobina (Antonini & Brunori, 1971) liberada do interior da hemácia, quando há hemólise.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância com auxílio do programa estatístico SAS com intervalo de confiança de 5%, e as médias foram plotadas em função da concentração de surfatante. Como controle da osmolaridade dos eritrócitos foi utilizado tampão fosfato 5 mM com 0,45% de NaCl, pH 7,4. As concentrações cujas médias das absorbâncias das amostras diferiram significativamente do controle com absorbância média superior a esse foram consideradas hemolíticas. As que diferiram do controle com absorbância média inferior foram consideradas hemoprotetoras e as concentrações cujas médias das absorbâncias das amostras não diferiram do controle foram consideradas não hemolíticas e não protetoras.

### **3.4.2 Alteração da fluidez das membranas de eritrócitos humanos**

Para os estudos da alteração da fluidez das membranas causada pelos surfatantes foram utilizadas preparações de “ghosts”, que são membranas de hemácias esvaziadas de seu conteúdo, e lavadas. Os “ghosts” foram preparados a partir de sangue humano coletado e lavado segundo o método descrito no item anterior. A suspensão de hemácias obtida após a última lavagem foi dividida em oito tubos,

sendo o volume da suspensão em cada tubo de aproximadamente 1 mL. O volume de cada tubo foi completado com tampão fosfato 5 mM, pH 8,0, até 20 mL.

Os tubos contendo suspensão de hemácias diluídas em tampão fosfato foram centrifugados a 12000 x g, por 30 minutos, a 4°C. Após cada centrifugação o sobrenadante contendo hemoglobina foi retirado e o volume novamente completado com tampão. Esse procedimento foi repetido até que se obtivessem as membranas livres de hemoglobina contaminante (membranas esbranquiçadas, observadas a olho nu).

As membranas foram ressuspensas em tampão fosfato 5mM pH 7,4 e novamente centrifugadas a 12000 x g por 15 minutos, a fim de se obter um precipitado mais concentrado. A preparação de "ghosts" finalmente obtida foi submetida à determinação da concentração de proteína total estimada pelo método de Lowry (1951), utilizando curva padrão preparada com soroalbumina bovina.

Alíquotas de 100  $\mu$ L da suspensão de "ghosts" foram adicionadas a igual volume dos surfatantes em concentrações que variaram de 0 a 1 mM. A essas amostras foi adicionado marcador de spin (ácido 5-DOXIL esteárico) na concentração de 0,05 mM e os espectros das amostras foram obtidos a 37°C.

O parâmetro de ordem (S) das membranas, foi calculado como descrito para as micelas. As membranas são consideradas mais fluidas quanto menor o valor de S.

## **4. Resultados e Discussão**

### **4.1 Caracterização dos Surfatantes**

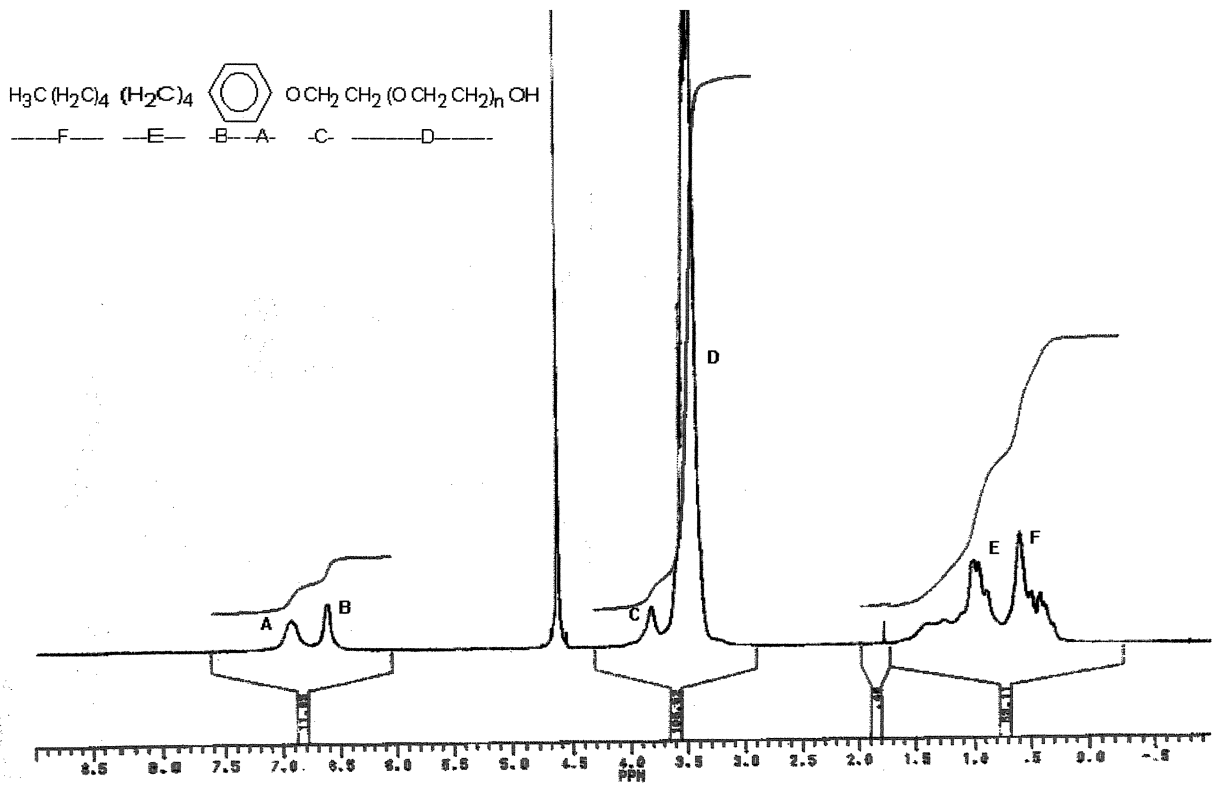
#### **4.1.1 Grau de Pureza**

##### **4.1.1.1 Ressonância Magnética Nuclear**

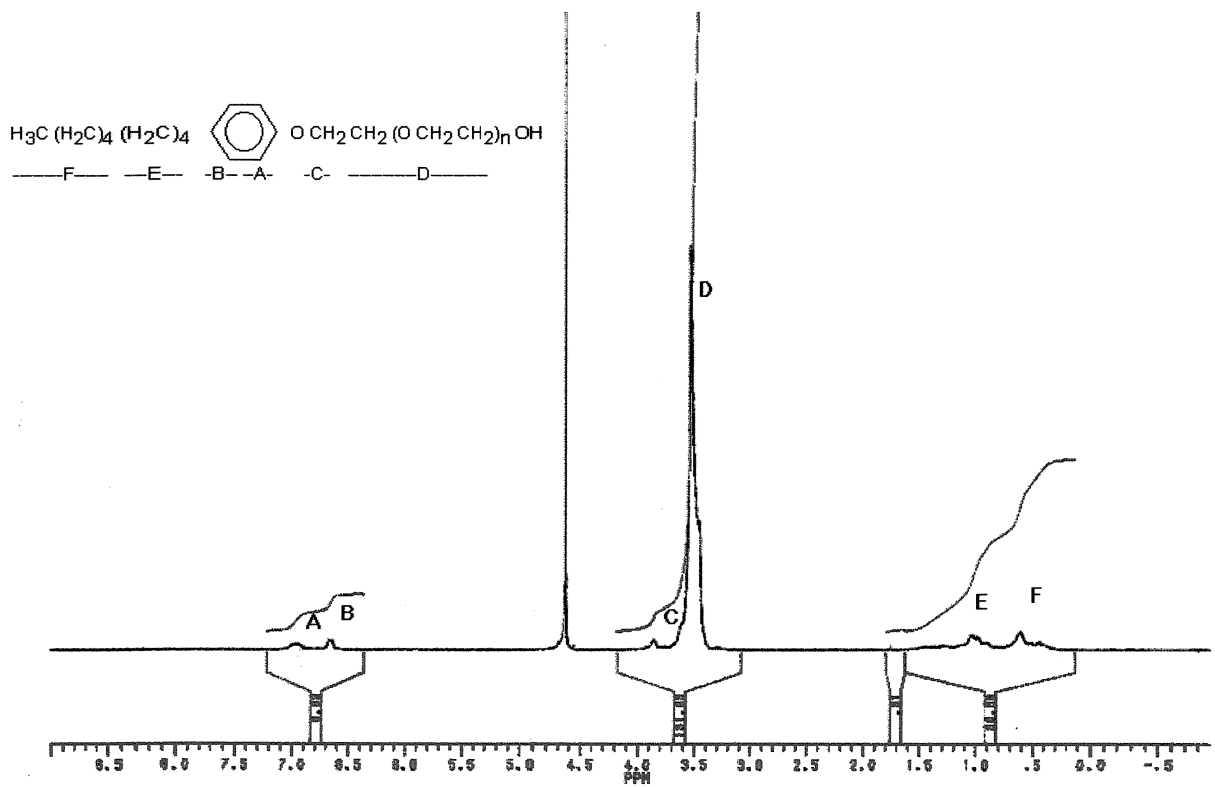
Os espectros de  $^1\text{H}$  RMN obtidos para os três surfatantes utilizados apresentam-se de acordo com os espectros obtidos por Greff & Flangran (1963) e Crutchfield et al. (1964). A análise dos picos (Figuras 5, 6 e 7) não acusa a presença de nenhum pico que não possa ser atribuído à molécula de nonilfenol etoxilado. O número de unidades de óxido de etileno por molécula foi calculado utilizando-se as integrais dos picos correspondentes. O resultado está de acordo com o indicado pelo fabricante (Tabela II).

O número de prótons na cadeia de OE e de NP foi determinado pela integral dos picos a 3,5 ppm (D) e 0,5 e 1,0 ppm (F e E) respectivamente, usando-se a integral dos picos a 6,6 e 7,0 ppm atribuídos aos prótons fenólicos (A e B) como referência.

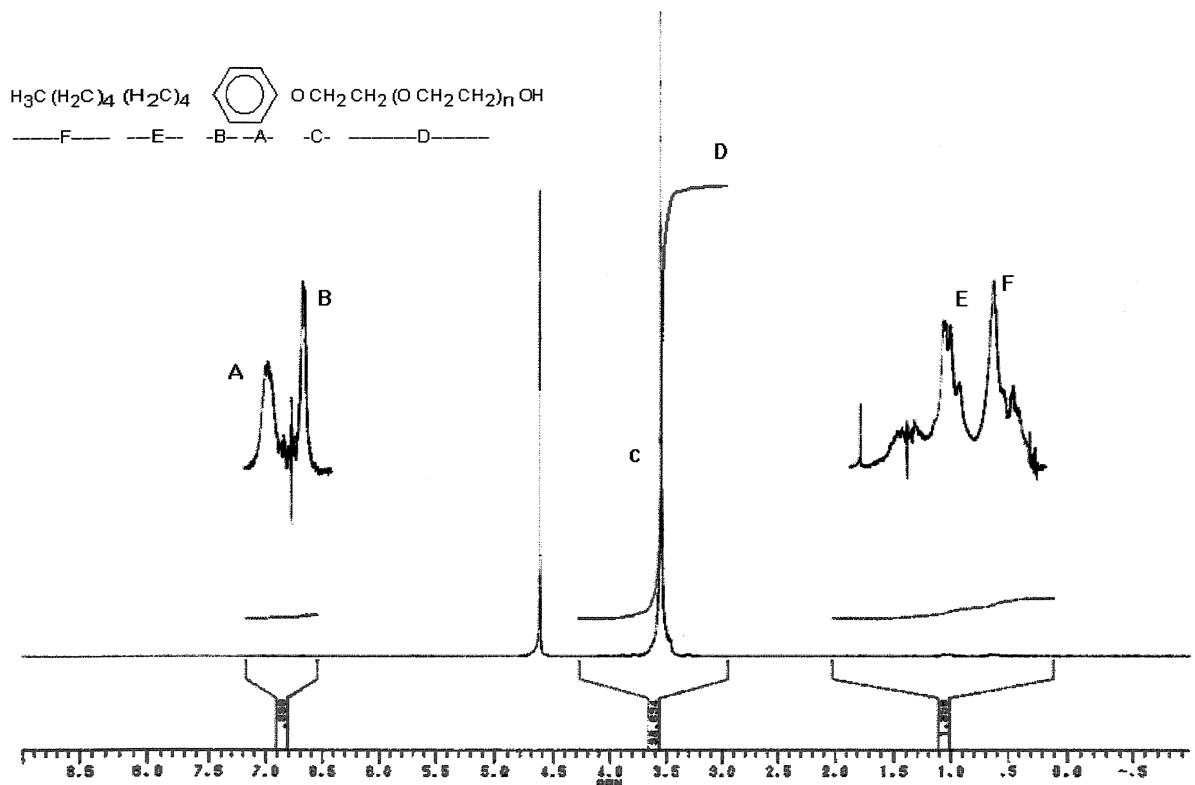
Foi analisada apenas uma amostra para cada surfatante estudado, e as medidas foram processadas a 25°C.



**Figura 5.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do Renex 95 em  $\text{D}_2\text{O}$  (1:9; volume,volume). 300 MHz,  $25^\circ\text{C}$ .



**Figura 6** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do Renex 200 em  $\text{D}_2\text{O}$  (1:9; volume,volume). 300 MHz,  $25^\circ\text{C}$ .



**Figura 7** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do Renex 1000 em  $\text{D}_2\text{O}$  (1:9; volume,volume). 300 MHz,  $25^\circ\text{C}$ .

**Tabela II. Identificação dos picos de  $^1\text{H}$ -RMN dos surfatantes da série Renex.**

| Renex | Pico  | Atribuição | Nº de $^1\text{H}$ esperado | Nº de $^1\text{H}$ observado |
|-------|-------|------------|-----------------------------|------------------------------|
| 95    | A ; B | Fenol      | 4                           | Referência                   |
| 95    | C ; D | OE         | 38                          | 38                           |
| 95    | E ; F | Nonil      | 19                          | 19                           |
| 200   | A ; B | Fenol      | 4                           | Referência                   |
| 200   | C ; D | OE         | 80                          | 79.7                         |
| 200   | E ; F | Nonil      | 19                          | 18.6                         |
| 1000  | A ; B | Fenol      | 4                           | Referência                   |
| 1000  | C ; D | OE         | 400                         | 455                          |
| 1000  | E ; F | Nonil      | 19                          | 22                           |

Para o Renex 1000, observa-se na tabela II, que o número de prótons observado é cerca de 15% a mais que o esperado, tanto para a cadeia de polióxido de etileno quanto para o grupamento nonil. Essa diferença pode ser justificada pela grande diferença entre o número de prótons nos picos A e B e nos picos C e D, no espectro da Figura 7, é possível observar que existe uma menor resolução dos picos A e B (usados como referência), que pode ter causado uma imprecisão nos cálculos. Porém observa-se que se tomarmos por referência o valor da integral dos picos E e F, o número de prótons observado estará de acordo com o esperado com 99% de exatidão.

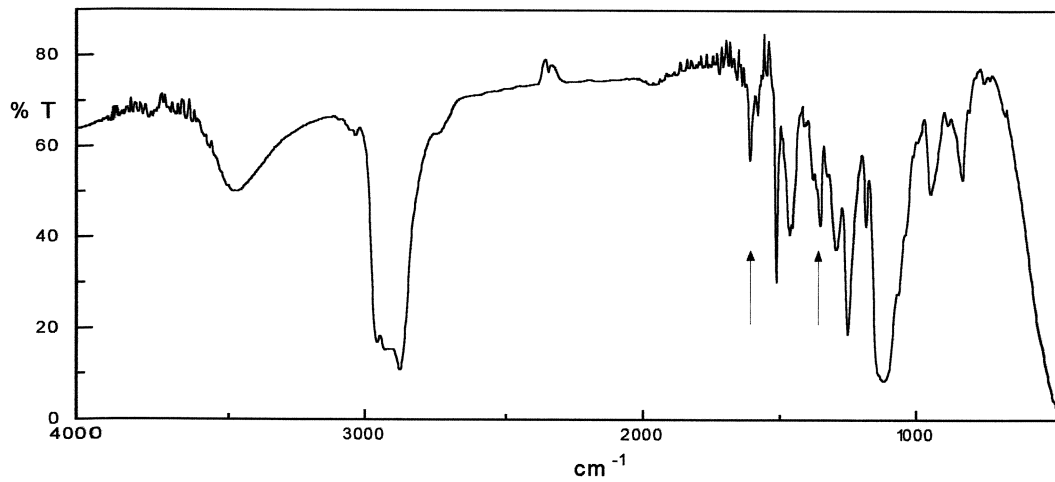


#### 4.1.1.2 *Infra Vermelho*

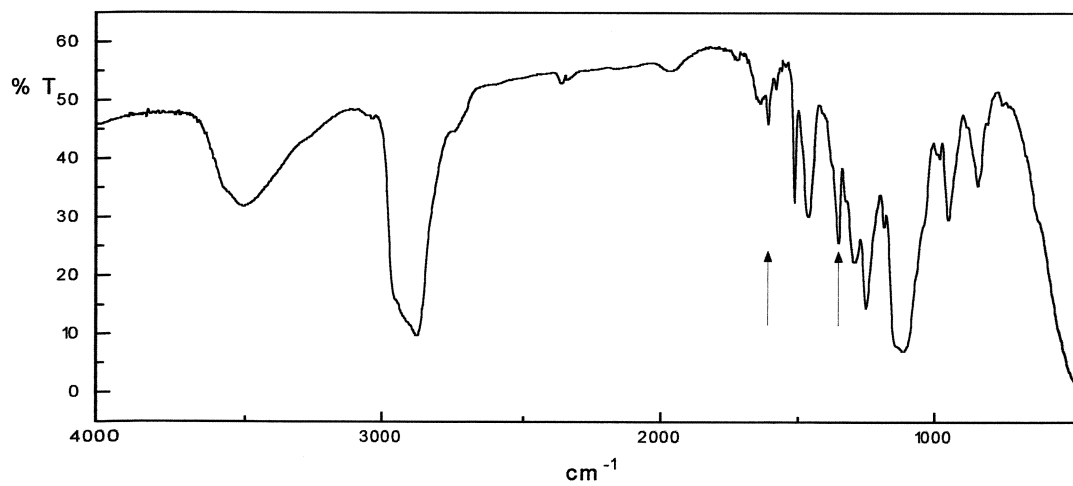
Através dos espectros de IV, Figuras 8, 9 e 10, foi calculada a relação das absorvâncias em 1350 e 1610  $\text{cm}^{-1}$  ( $A_{1350}/A_{1610}$ ) (Meszlényi, 1991) de onde foi possível determinar a constante  $c$  para as moléculas estudadas. A constante  $c$  (item 3.3.1.2) estabelece uma relação direta entre  $A_{1350}/A_{1610}$  e o número de cadeias de OE (Tabela III).

As medidas de infra-vermelho serviram para confirmar que a relação entre o número de cadeias de OE entre os surfatantes utilizados está de acordo como indicado pelo fabricante. Ou seja, o valor da relação  $A_{1350}/A_{1610}$  para o Renex 95 é metade do valor da relação para o Renex 200 e um décimo do valor da relação para o Renex 1000. Isso significa que o número de cadeias de OE do Renex 95 é metade do número de cadeias do Renex 200 e um décimo do do número de cadeias do Renex 1000, assim como indicado pelo fabricante, e observado com maior precisão, nos experimentos de NMR.

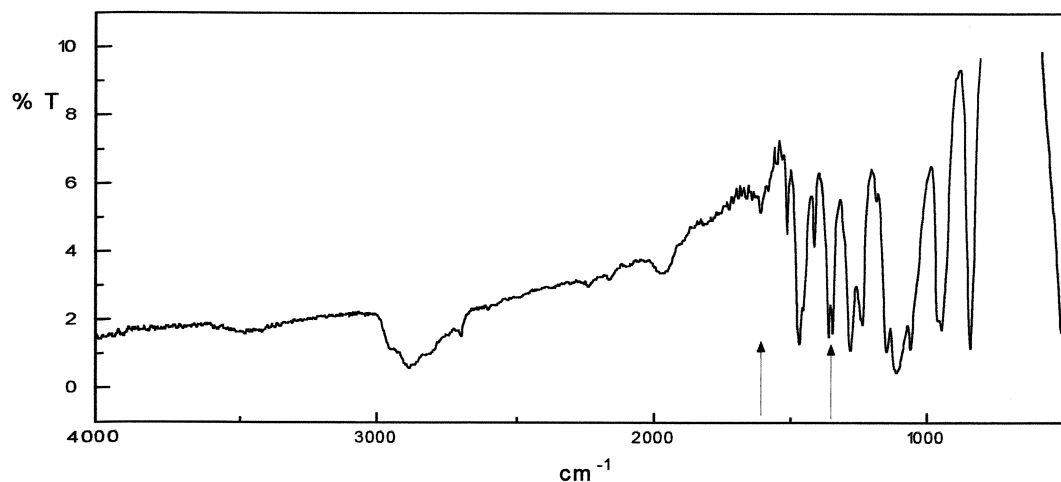
Foi analisada apenas uma amostra para cada surfatante estudado, e as medidas foram processadas a 25°C.



**Figura 8** Espectro de Infra - vermelho do Renex 95. Amostra pura a 25°C.



**Figura 9** Espectro de Infra - vermelho do Renex 200. Amostra pura a 25°C.



**Figura 10** Espectro de Infra - vermelho do Renex 1000. Amostra pura a 25°C.

**Tabela III.** Determinação de  $c$  para os surfatantes da série Renex através dos espectros de infra vermelho a 25°C.

| Renex | $A_{1350}/A_{1610}$ | Nº de moles de OE | $c$ |
|-------|---------------------|-------------------|-----|
| 95    | 6,5                 | 9,5               | 1,5 |
| 200   | 13                  | 20                | 1,5 |
| 1000  | 66                  | 100               | 1,5 |

#### **4.1.2 Determinação de auto-oxidação dos estoques de surfatantes**

Segundo a metodologia utilizada (item 3.3.2) nenhuma das amostras estudadas sofreu auto - oxidação nas condições de estocagem (temperatura ambiente, ao abrigo de luz), durante os oito meses de realização dos experimentos.

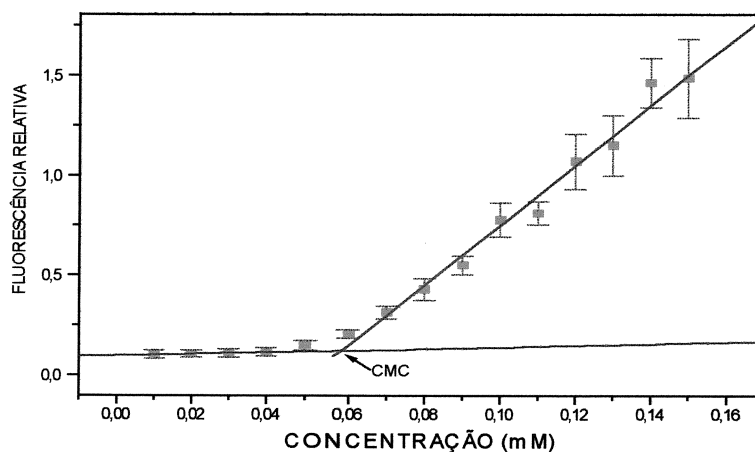
Em todos os experimentos realizados o valor de absorbância medido foi inferior a 0.01, o que significa que caso tenha ocorrido auto-oxidação a formação de peróxido nas amostras foi inferior a 0.005%, o que não seria suficiente para interferir nos experimentos.

#### **4.1.3 Determinação da CMC**

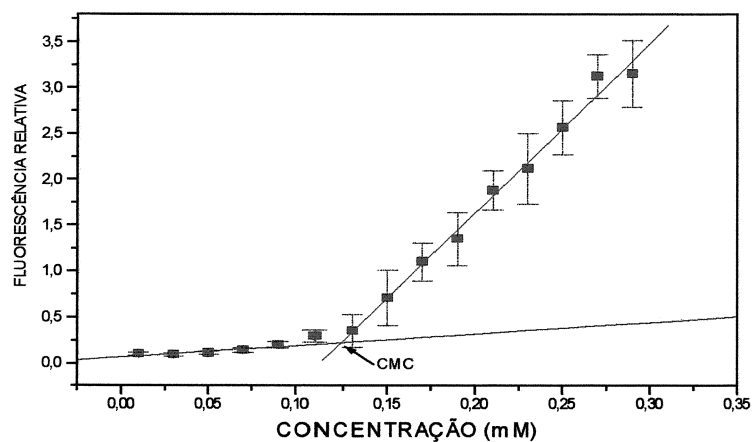
##### **4.1.3.1 Fluorescência**

As Figuras 11, 12 e 13, mostram gráficos da fluorescência relativa do ANS, medida em 490 nm, sendo a excitação feita em 345 nm (Mast & Haynes, 1975), em função da concentração de surfatante. O ponto de interseção entre as duas retas determina a CMC. Foram obtidos gráficos com os três surfatantes estudados. Para uma melhor comparação, os resultados das determinações de CMC encontram-se na Tabela IV, juntamente com os resultados das medidas de RPE e dados de literatura.

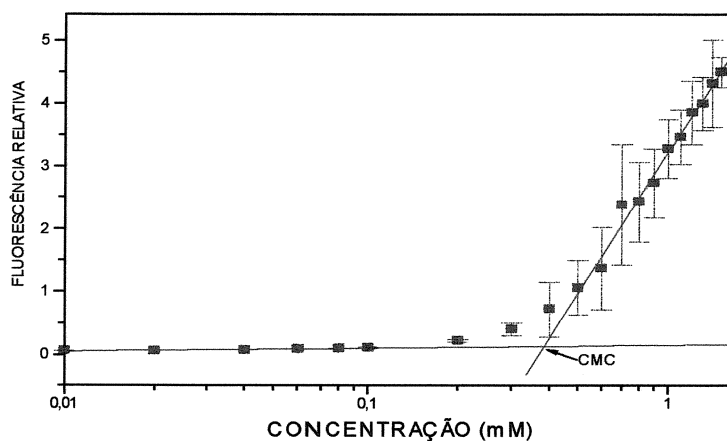
As medidas de fluorescência foram feitas em quintuplicata, e os valores médios com os respectivos desvios estão plotados nas Figuras 11, 12 e 13. As retas de regressão apresentadas nos gráficos são as que apresentaram maior correlação entre os pontos.



**Figura 11** Determinação da CMC do Renex 95, em tampão fosfato 0,5 mM pH 7,4 a 25°C, medindo-se fluorescência de ANS 20  $\mu\text{M}$ .  $\lambda_{\text{EM}}$  490 nm e  $\lambda_{\text{EX}}$  345 nm.



**Figura 12** Determinação da CMC do Renex 200, em tampão fosfato 0,5 mM pH 7,4 a 25°C, medindo-se fluorescência de ANS 20  $\mu$ M.  $\lambda_{EM}$  490 nm e  $\lambda_{EX}$  345 nm.

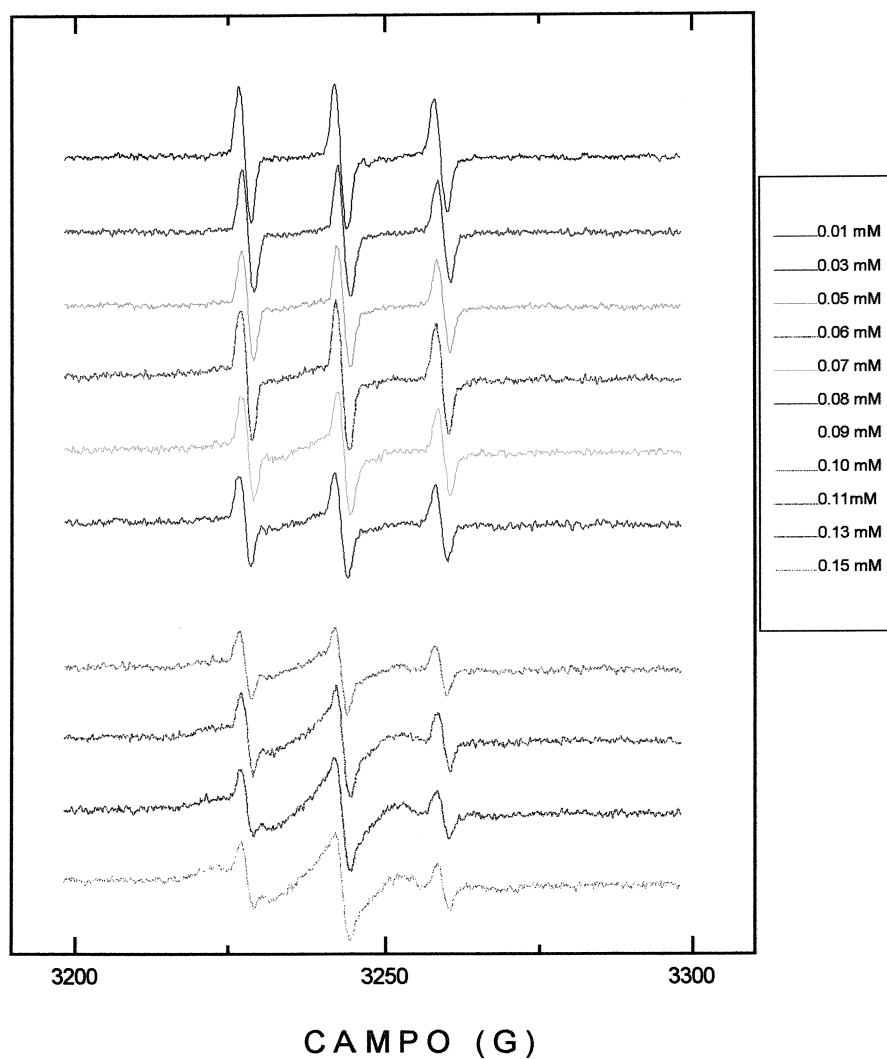


**Figura 13** Determinação da CMC do Renex 1000, em tampão fosfato 0,5 mM pH 7,4 a 25°C, medindo-se fluorescência de ANS 20  $\mu$ M.  $\lambda_{EM}$  490 nm e  $\lambda_{EX}$  345 nm.

#### **4.1.3.2 Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)**

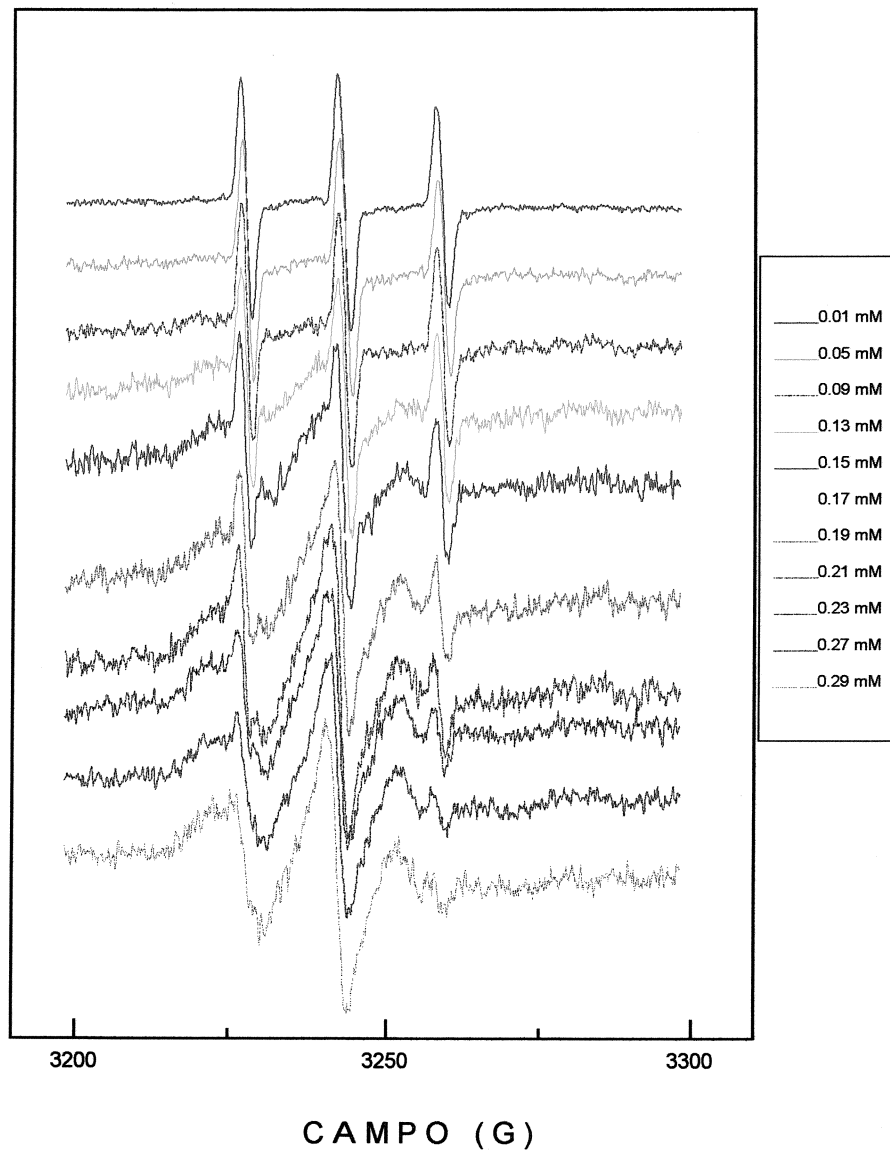
Foram obtidos os espectros de RPE do marcador ácido 5-DOXIL esteárico em soluções aquosas dos surfatantes. Os espectros estão apresentados nas Figuras 14, 15 e 16. Os espectros das soluções mais diluídas apresentam os picos muito bem definidos (isotrópicos), decorrente da maior quantidade de marcador livre. Com o aumento da concentração de surfatante, começam a se formar micelas e é possível notar que ocorre uma modificação nos espectros, observada por um alargamento nos picos, o que caracteriza a diminuição da mobilidade do marcador (anisotropia).

Dos espectros, foram medidos os valores de  $I_m$  e  $I_f$  (intensidade dos picos relativos ao marcador imobilizado e livre, respectivamente) (Figura 4). Foi então estabelecida a relação  $I_m/I_f$  e os valores obtidos foram plotados em função da concentração de surfatante (Figuras 17, 18 e 19). Através do mesmo procedimento do item anterior foi calculada a CMC (Tabela IV).

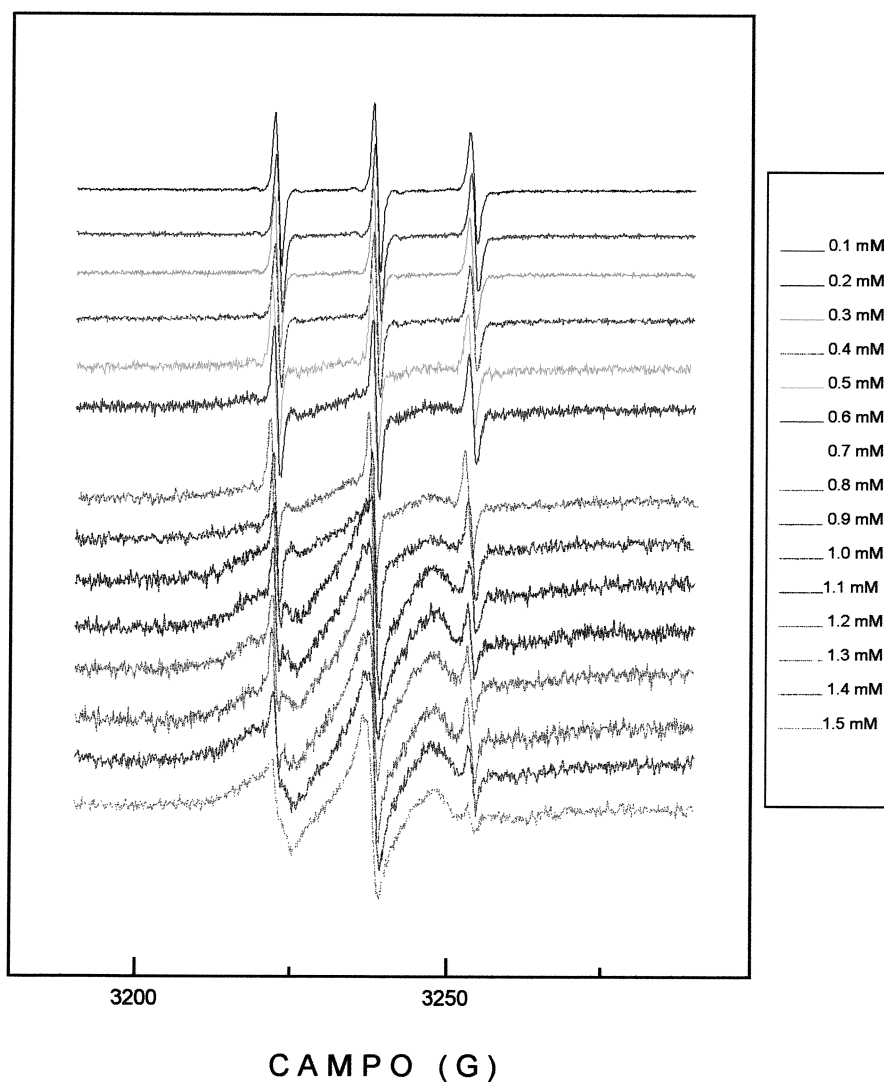


**Figura 14** Espectros de RPE do marcador ácido 5-DOXIL esteárico (0,01 mM) em concentrações crescentes de Renex 95; tampão fosfato 0,5 mM pH 7,4 a 25°C.

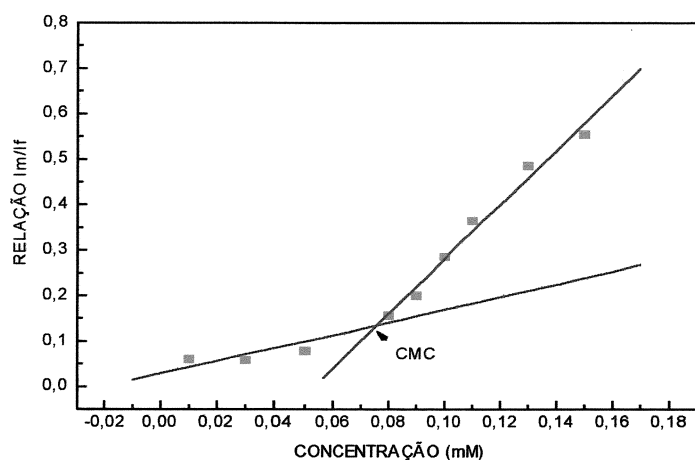




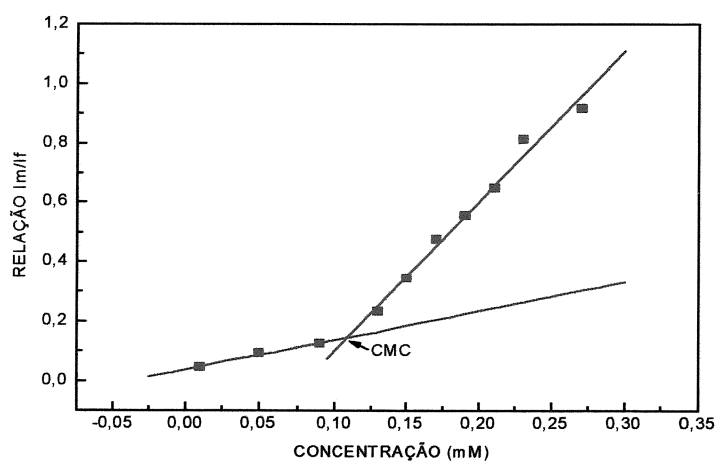
**Figura 15** Espectros de RPE do marcador ácido 5-DOXIL esteárico (0,01 mM) em concentrações crescentes de Renex 200; tampão fosfato 0,5 mM pH 7,4 a 25°C.



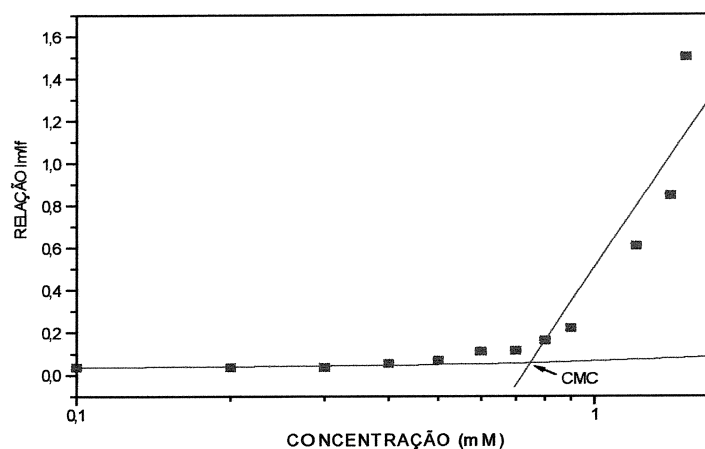
**Figura 16** Espectros de RPE do marcador ácido 5-DOXIL esteárico (0,01 mM) em concentrações crescentes de Renex 1000; tampão fosfato 0,5 mM pH 7,4 a 25°C.



**Figura 17** Determinação da CMC do Renex 95, em tampão fosfato 0,5 mM pH 7,4, 25°C, por RPE, usando como marcador ácido 5-DOXIL esteárico (0,01 mM).



**Figura 18** Determinação da CMC do Renex 200, em tampão fosfato 0,5 mM pH 7,4, 25°C, por RPE, usando como marcador ácido 5-DOXIL esteárico (0,01 mM).



**Figura 19** Determinação da CMC do Renex 1000, em tampão fosfato 0,5 mM pH 7,4, 25°C, por RPE, usando como marcador ácido 5-DOXIL esteárico (0,01 mM).

**Tabela IV.** Valores da CMC dos surfatantes da série Renex, determinados por fluorescência e RPE e comparação com os dados da literatura<sup>2</sup> e HLB<sup>3</sup>

| Renex | CMC (mM)      |       |               | HLB  |
|-------|---------------|-------|---------------|------|
|       | Fluorescência | RPE   | Literatura    |      |
| 95    | 0,06 ± 0,01   | 0,075 | 0,078 - 0,092 | 13,0 |
| 200   | 0,11 ± 0,02   | 0,11  | 0,14 - 0,18   | 16,1 |
| 1000  | 0.40 ± 0.10   | 0,75  | 1,0           | 19,0 |

<sup>2</sup> Shonfeldt, 1972.

<sup>3</sup> Dado do fabricante.

Os experimentos de RPE não foram repetidos, porém os resultados obtidos através dessa técnica são mais confiáveis que os obtidos por fluorescência, pois permitem monitorar tanto a quantidade de marcador imobilizado na micela como livre na solução, e através dessa relação é possível ter uma visão mais precisa da CMC.

No caso do Renex 1000, a CMC apontada por fluorescência é um valor bem abaixo do esperado, isso pode ser explicado pelo fato das micelas do Renex 1000 apresentarem um número de agregação muito baixo (menor que 20) (Schick, 1963), resultando em micelas com uma região hidrofóbica muito pequena, e instável, devido à alta mobilidade das moléculas de detergente, ou seja, a região hidrofóbica necessária para que o ANS emita fluorescência não apresenta condições “ideais” para isso.

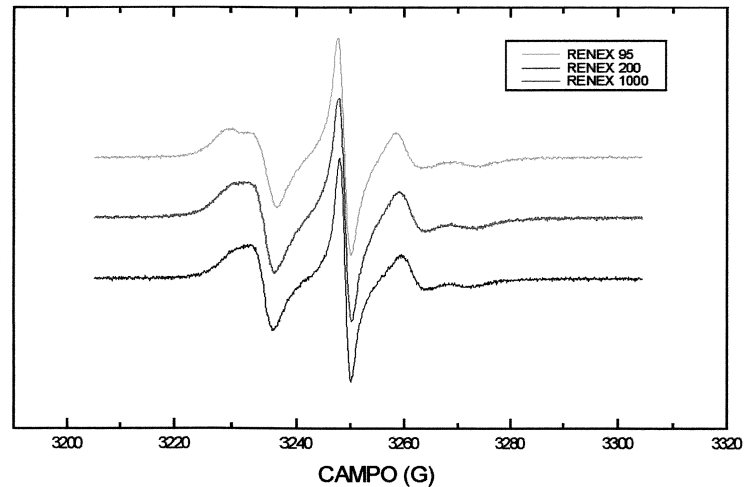
#### 4.1.4 Determinação da fluidez das micelas

O parâmetro de ordem (S) foi calculado a partir dos espectros do marcador totalmente contido nas micelas de cada surfatante (Figura 20). Quanto menor o S, menos ordenado é o domínio apolar da micela que contém o marcador de spin. A Tabela V mostra os valores obtidos, tendo sido feita apenas uma medida para cada amostra.

A Tabela V mostra que as micelas de Renex 1000 são as mais fluidas, enquanto as de Renex 95 são as menos fluidas.

**Tabela V. Parâmetro de ordem (S) para as micelas de surfatantes.**

| Renex | S    |
|-------|------|
| 95    | 0,39 |
| 200   | 0,34 |
| 1000  | 0,32 |



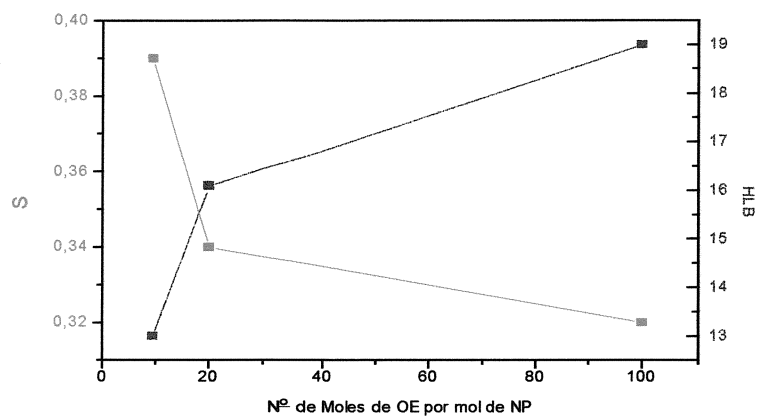
**Figura 20** Espectro do marcador ácido 5-DOXIL esteárico (0.05 mM) totalmente imobilizado em micelas de Renex (20 mM), tampão fosfato 0,5 mM pH 7,4, 37°C.

O Renex 95 apresenta o menor HLB, o que significa que as moléculas são mais hidrofóbicas, o que lhes propicia um empacotamento mais denso das caudas apolares quando micelizadas em um meio polar, resultando na formação de micelas em concentrações mais baixas (CMC = 0,075 mM) que os demais. A interface dessas micelas é menos fluída que a das micelas de Renex 1000, devido à maior proximidade das cadeias apolares.

O Renex 1000 apresenta o maior HLB (igual a 19 numa escala cujo máximo é 20), caracterizando uma molécula cujo bloco hidrofílico é bastante volumoso. Portanto, as caudas apolares não sofrem um

empacotamento tão grande quando em meio polar, o que resulta na formação de micelas em concentrações mais altas (0,75 mM, dez vezes maior que o Renex 95). Os domínios apolares das micelas formadas são mais fluídos que os do Renex 95, devido a esse menor empacotamento entre as moléculas.

A Figura 21 apresenta um gráfico onde é possível observar que existe uma relação entre HLB e S, ou seja existe uma relação entre a hidrofobicidade da molécula e a rigidez da molécula formada.



**Figura 21** Variação do HLB e S em relação ao tamanho da cadeia de OE. Valores de HLB fornecidos pelo fabricante, S foi determinado por RPE (Tabela III).



## **4.2 Interação dos surfatantes com membranas biológicas**

### **4.2.1 Teste hemolítico**

A Figura 22 apresenta os resultados dos testes hemolíticos em eritrócitos preparados segundo o item 3.4.1. Observou-se a presença de hemoglobina em solução (Absorbância a 540 nm) após o tratamento das hemácias com surfatantes e centrifugação. As concentrações cujas absorbâncias foram maiores que a do controle (concentração zero de surfatante) foram consideradas hemolíticas, e as com absorbâncias menores que o controle, hemoprotetoras. As concentrações de 0,015 e 0,03 mM do Renex 95, 0,015 a 0,25 mM do Renex 1000 e toda a faixa do Renex 200 não diferiram do controle.

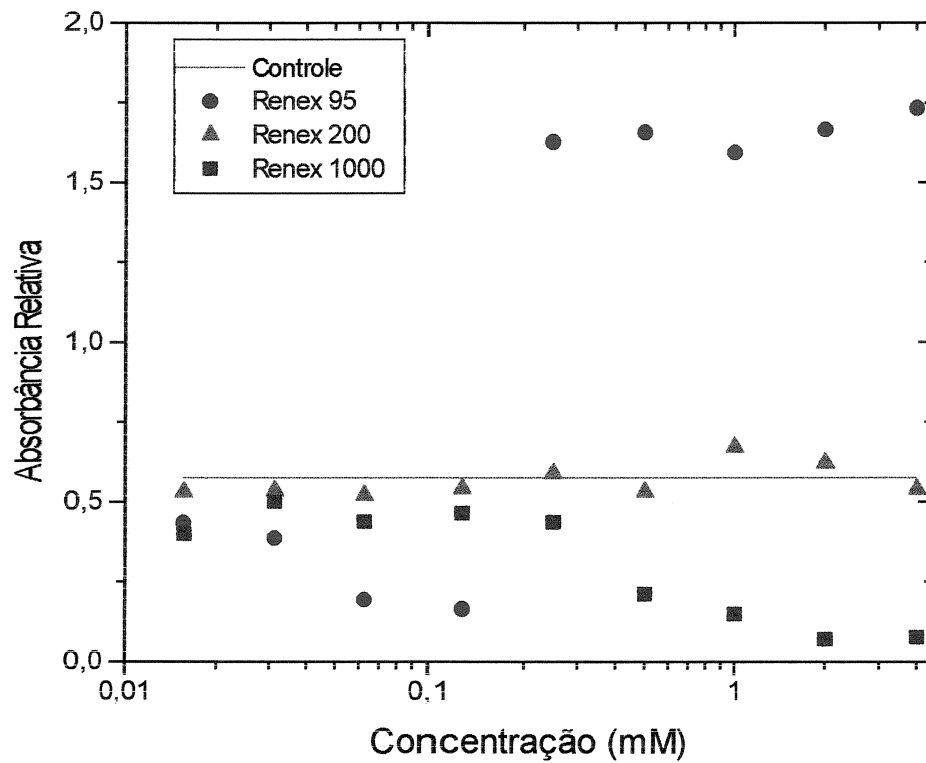
O Renex 95 apresentou um efeito bifásico, sendo protetor da hemólise em baixas concentrações e hemolítico em altas (Figura 22). Esse efeito bifásico do Renex 95 é bem característico, sendo observado em grande parte dos anfifílicos (Seeman, 1972; Tranger & Csordas, 1987). Essa propriedade de hemólise ou proteção foi observada também em outros compostos de natureza anfifílica, tais como fenotiazínicos anestésicos (Seeman, 1966; Seeman & Weinstein, 1966 e Meirelles & Glaser, 1994). Rybczynska e Csordas (1989), observaram que esse efeito bifásico nos ácidos graxos livres não era correlacionado com a CMC.

O Renex 95 também apresentou efeito hemolítico em experimento realizado em meio isosmótico, o que sugere que uma etapa do mecanismo pelo qual esse surfatante causa a hemólise, é a ruptura da membrana (Bielawski, 1990).

O Renex 200 não apresentou propriedade hemolítica ou protetora, apesar de ter sido observado que essas moléculas têm a capacidade de se incorporar à membrana, causando alteração na fluidez (ítem 4.2.2).

O Renex 1000 apresentou uma eficiente ação protetora da hemólise, efeito esse que provavelmente ocorre devido à cadeia de POE muito grande (100 unidades OE), o que sugere a formação uma “capa” hidrofílica ao redor do eritrócito. O alto HLB dessas moléculas contribui para esse efeito protetor da hemólise observado.

Para o Renex 200 e Renex 1000, foram feitos experimentos para observar se o comportamento observado para cada um deles se alteraria em uma concentração ainda maior de surfatante, e o que foi observado, é que o efeito desses surfatantes a 10 e 20 mM, é semelhante ao efeito observado na Figura 22 na concentração de 4mM (maior concentração plotada), o que indica que o efeito desses surfatantes na hemólise não sofre alterações em concentrações acima das plotadas na Figura 22.



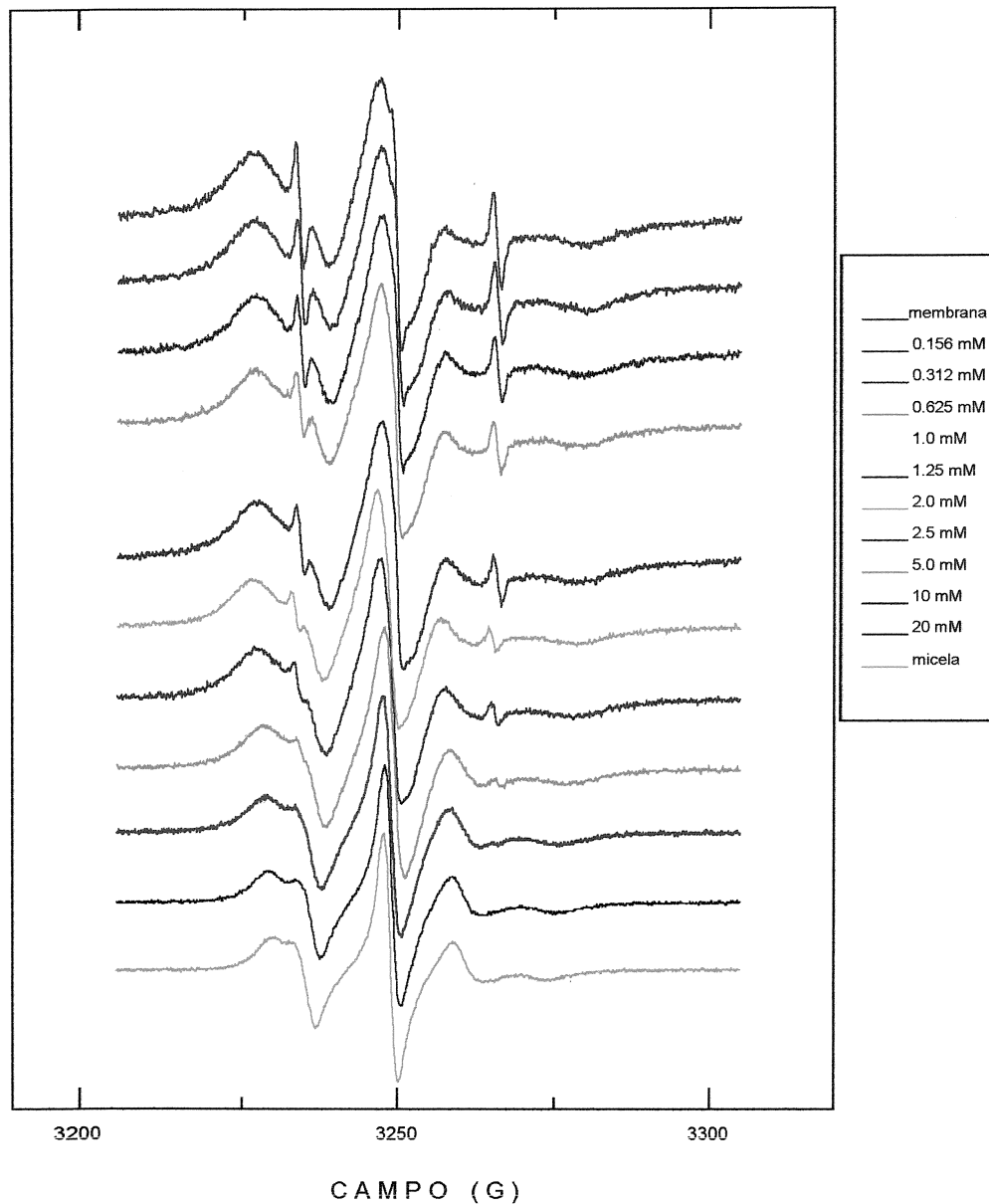
**Figura 22.** Absorbâncias a 540 nm das suspensões de hemácias (2% em PBS), incubadas com surfatantes da série Renex em tampão fosfato 5 mM, durante 15 min. a 25°C, pH 7,4.

#### **4.2.2 Alteração da fluidez das membranas de eritrócitos causada pelos surfatantes da série Renex.**

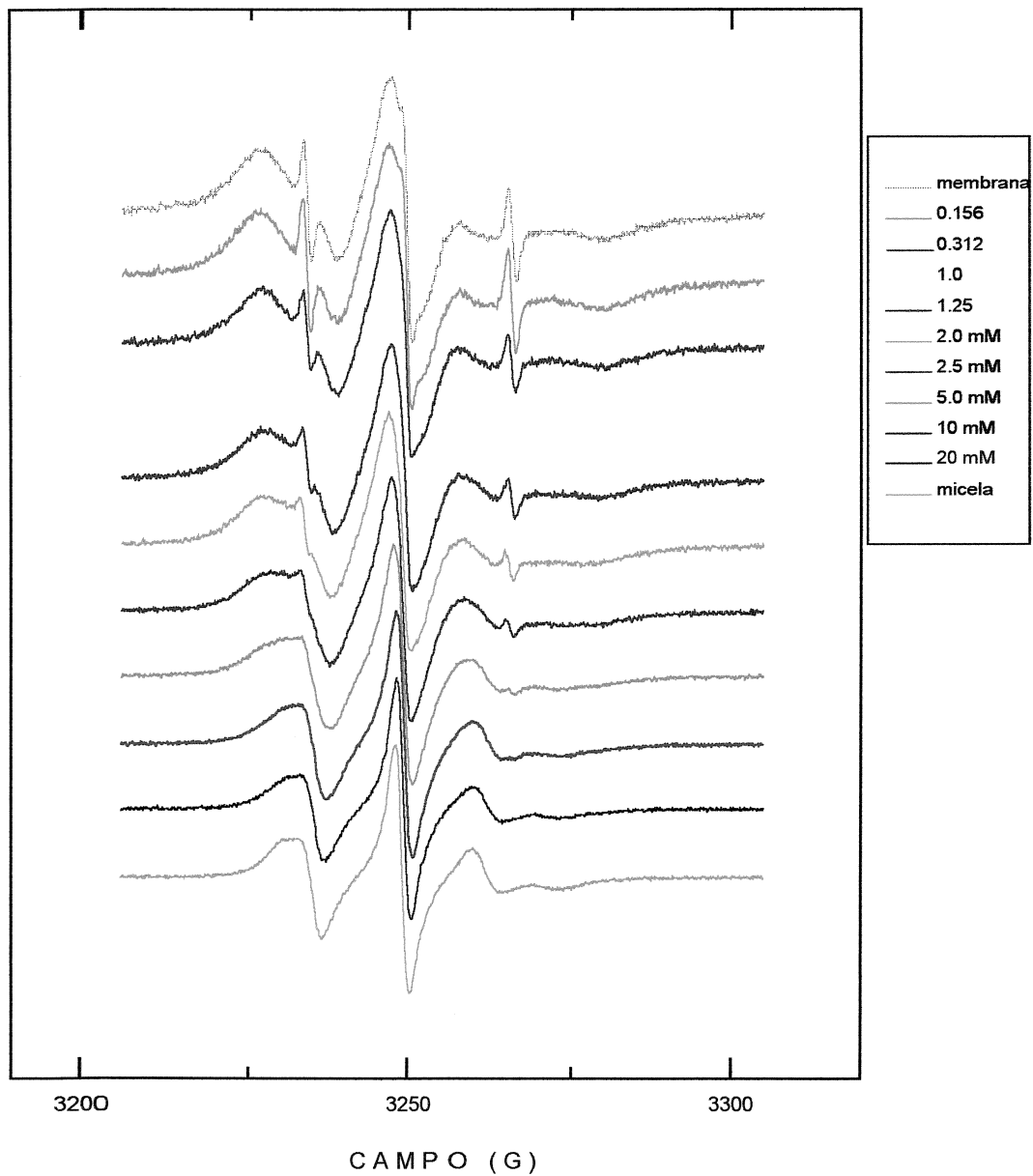
Utilizando “ghosts” de eritrócito (preparados segundo o item 3.4.2) na concentração de 3,5 mg de proteínas por ml, determinou-se o parâmetro de ordem (S) para as membranas.

As Figuras, 23, 24 e 25 apresentam os espectros dos quais os valores de  $2T'_{//}$  e  $2T'_{\perp}$  foram obtidos para o cálculo de S.

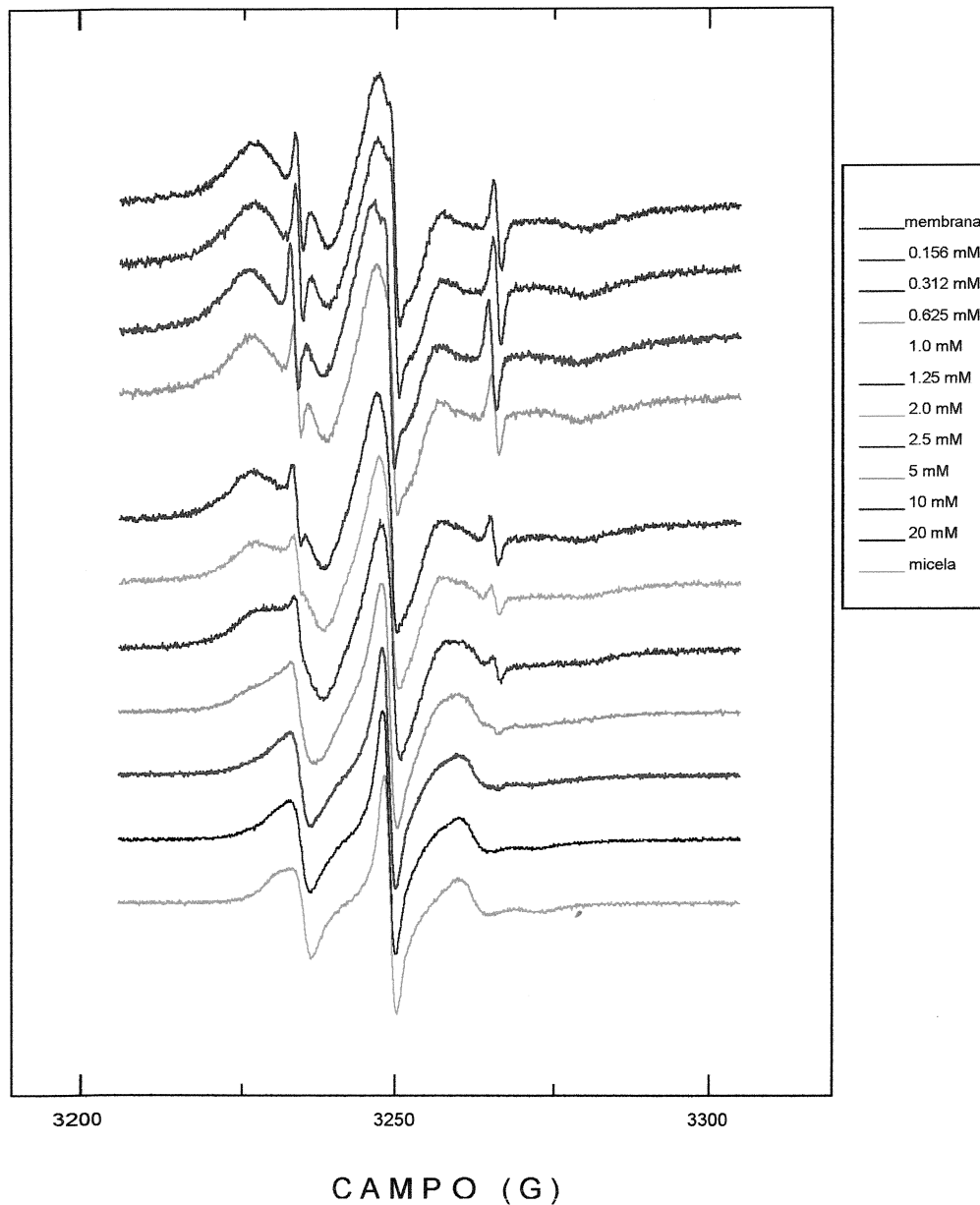
As Figuras 26, 27 e 28 apresentam os valores de S obtidos na presença dos surfatantes Renex 95, 200 e 1000, respectivamente, plotados em função da concentração de surfatante. Para comparação, são também fornecidos os valores de S para as membranas sem surfatante e para as micelas de surfatantes.



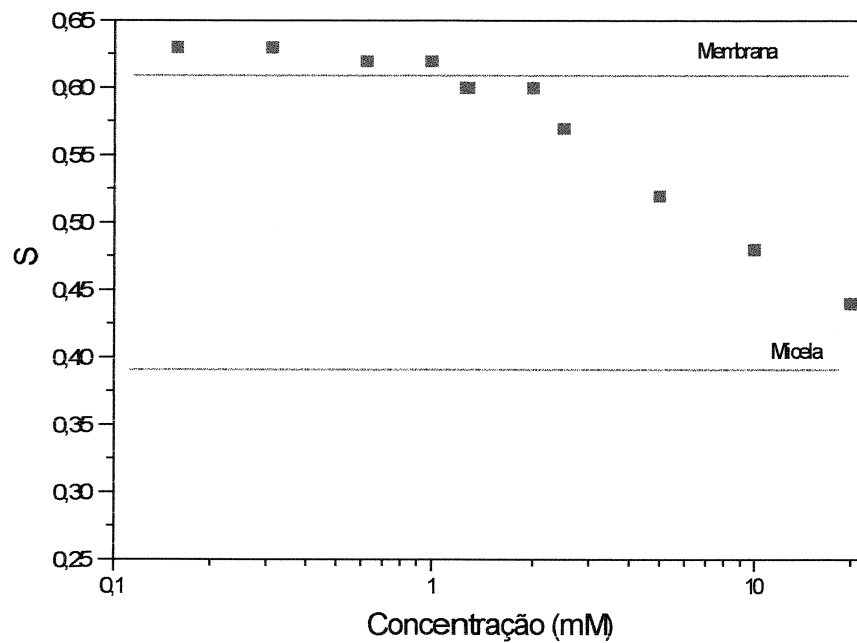
**Figura 23** Variação da fluidez em membranas de “ghosts” (3,5 mg de proteína por mL) com o aumento na concentração de Renex 95. Tampão fosfato 5mM pH = 7,4 a 37°C e 0,05 mM de ácido 5-DOXIL esteárico.



**Figura 24** Variação da fluidez em membranas de "ghosts" (3,5 mg de proteína por mL) com o aumento na concentração de Renex 200. Tampão fosfato 5 mM pH = 7,4 a 37°C e 0,05 mM de ácido 5-DOXIL esteárico.

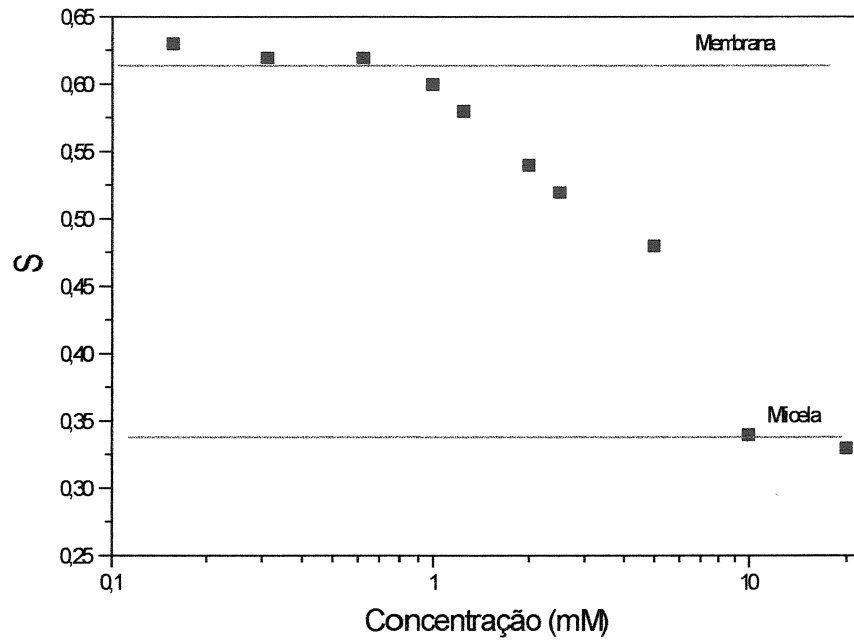


**Figura 25** Variação da fluidez em membranas de “ghosts” (3,5 mg de proteína por mL) com o aumento na concentração de Renex 1000. Tampão fosfato 5 mM pH = 7,4 a 37°C e 0,05 mM de ácido 5-DOXIL esteárico.

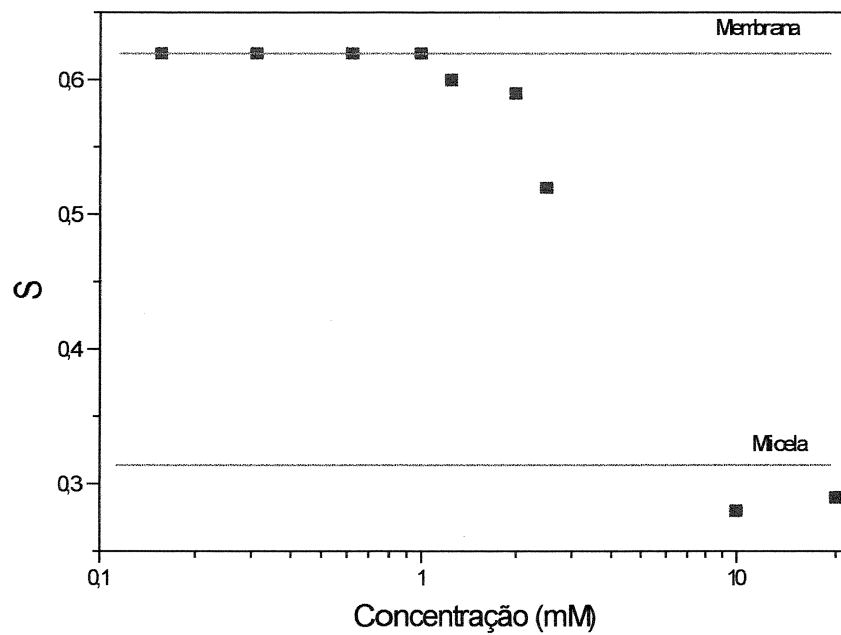


**Figura 26** Variação da fluidez de “ghosts” (3,5 mg de proteína por mL) de eritrócito humano na presença de Renex 95. S foi medido em espectros de RPE do marcador 5-DOXIL (0,05mM). Tampão fosfato 5 mM, pH 7,4, 37°C.





**Figura 27** Variação da fluidez de “ghosts” (3,5 mg de proteína por mL) de eritrócito humano na presença de Renex 200. S foi medido em espectros de RPE do marcador 5-DOXIL (0.05mM). Tampão fosfato 5 mM, pH 7,4, 37°C.



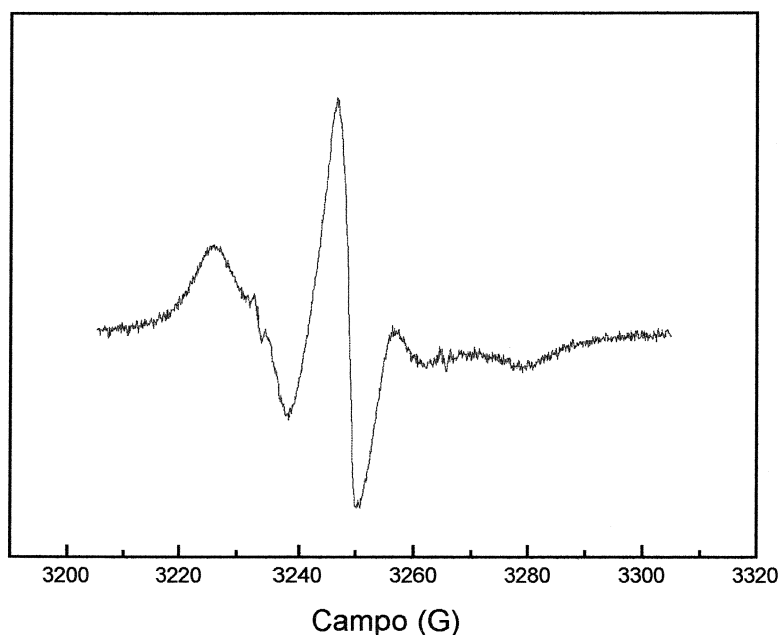
**Figura 28** Variação da fluidez de “ghosts” (3,5 mg de proteína por mL) de eritrócito humano na presença de Renex 1000. S foi medido em espectros de RPE do marcador 5-DOXIL (0.05 mM). Tampão fosfato 5 mM, pH 7,4, 37°C.

É importante lembrar que o marcador de spin utilizado nesse experimento se liga tanto às membranas quanto às micelas. O espectro total registrado é uma somatória dos espectros do marcador de spin nos diferentes ambientes em que esse se encontra, sendo predominante o sinal da estrutura (membrana ou micela) que contiver a maior fração do marcador de spin.

Nas Figuras 26, 27 e 28, é possível observar algumas situações distintas: a) uma região em que a concentração de surfatante no meio é muito pequena, predominando o sinal do marcador na membrana (Figura 29). A fluidez desta permanece então praticamente inalterada já que os valores de  $S$  são então muito próximos do valor de  $S$  para as membranas sem surfatantes; b) uma região em que é possível observar alteração na fluidez das membranas causada pelos surfatantes: nos espectros, o sinal predominante ainda é do marcador nas membranas e os valores de  $S$  são menores que os observados para as membranas na ausência de surfatante; c) as membranas estão na presença de concentrações elevadas de surfatante e o sinal predominante passa a ser o das micelas. O valor de  $S$  se aproxima dos valores de  $S$  das micelas de surfatante puros.

Porém, nota-se na Figura 26 que na concentração máxima de surfatante utilizada (20 mM) não foi ainda atingido o  $S$  das micelas de Renex 95 puro. Esse fato pode ser explicado pela capacidade do Renex 95 de romper a membrana eritrocitária, formando agregados denominados micelas mistas (Neugebauer, 1994). Estas apresentam

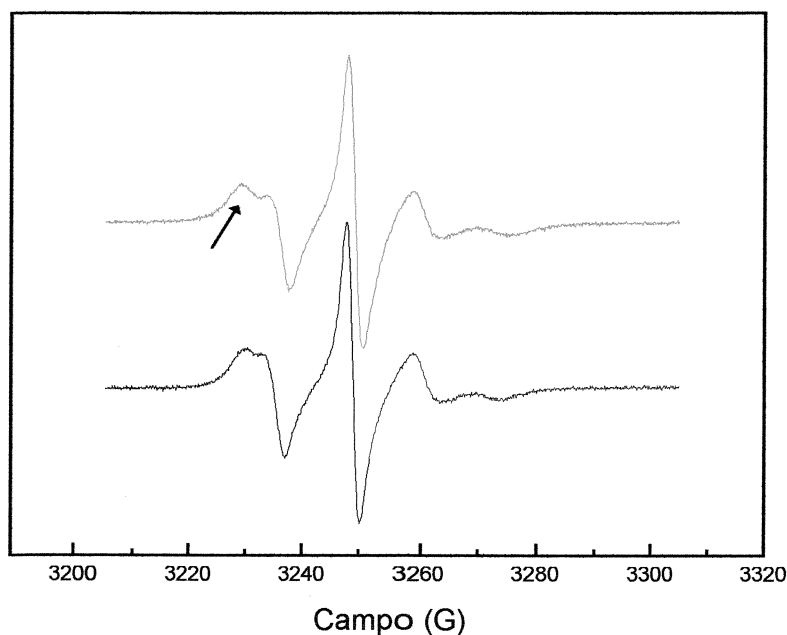
um valor de S maior que o das micelas do Renex 95 puro, devido à presença dos fosfolípidios incorporados às micelas, proporcionando a elas uma maior rigidez.



**Figura 29** Espectro de RPE do marcador ácido 5-DOXIL esteárico (0.05 mM) em membranas de “ghosts” de eritrócitos (3,5 mg de proteína por mL), 37°C.

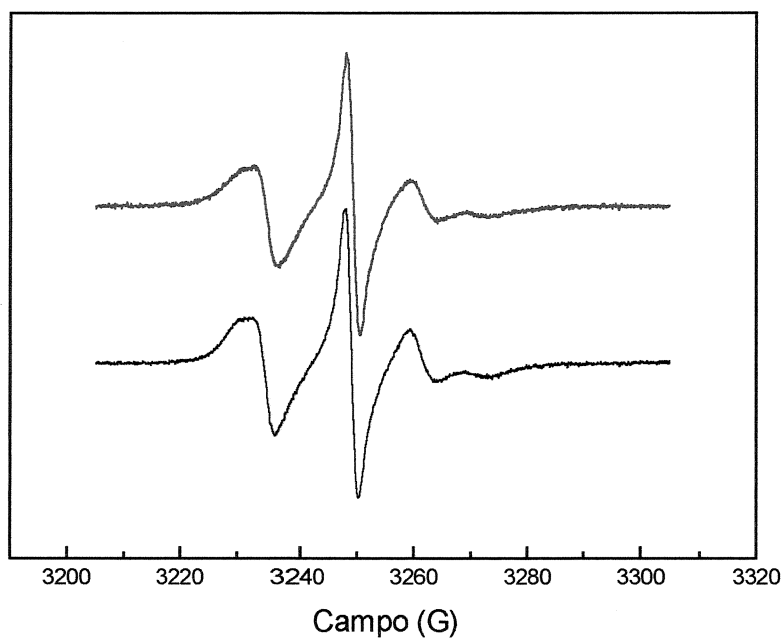
A Figura 30 mostra os espectros de RPE do marcador de spin, obtidos em solução 20 mM de Renex 95 na presença de “ghosts”, e na sua ausência. É possível observar que, no espectro do marcador em micela de Renex na presença de “ghosts” existe uma diferença (Figura 30), indicada por uma seta, que pode ser uma caracterização da

micela mista (presença de fosfolipídios intercalados às moléculas de surfatante), pois há um deslocamento do pico para uma região do espectro onde aparece o sinal do marcador quando em membranas. Resultado semelhante foi observado anteriormente nesse laboratório para surfatantes não-iônicos da série Tween (Ramos, 1991). Schreier e colaboradores (Frezzatti Jr. et al., 1986; Schreier et al., 1986; dePaula, 1993; dePaula & Schreier, 1995) atribuíram esse espectro à formação de micelas mistas: surfatante mais membranas. O ombro no espectro da Figura 30 é uma contribuição dos fosfolipídios.



**Figura 30** Espectros de RPE do ácido 5-DOXIL esteárico em micelas de Renex 95 20 mM; (—) puro, (—) em suspensão de “ghosts” (3,5 mg de proteína por mL). Tampão fosfato 5 mM, pH 7,4 a 37°C.

Nas Figuras 27 e 28 observamos que em altas concentrações de surfatante o valor de  $S$  se encontra muito próximo do valor de  $S$  das micelas de surfatante puro. Além disso, nesses casos o espectro do marcador na presença de “ghosts” e de concentração elevada de surfatante é idêntico ao espectro obtido apenas na presença de surfatante, como mostra a Figura 31, para o Renex 200. Isto indica que nesse caso não existe solubilização da membrana eritrocitária e ainda que, após a saturação da membrana, as moléculas de surfatante passam a se agregar formando micelas, sem fosfolipídios. Para o Renex 1000 o espectro do marcador na presença de “ghosts” e de concentração elevada de surfatante também é idêntico ao espectro obtido apenas na presença de surfatante assim como foi observado para o Renex 200 na Figura 31.



**Figura 31** Espectros de RPE do ácido 5-DOXIL esteárico em micelas de Renex 200 20 mM; (—) puro, (—) em suspensão de “ghosts” (3,5 mg de proteína por mL). Tampão fosfato 5 mM, pH 7,4,37°C.

### **4.3 Considerações finais**

Os experimentos realizados para caracterizar os efeitos dos surfatantes em relação à hemólise em eritrócitos humanos, complementados com as determinações de fluidez das membranas (“ghosts”), dão uma visão global da interação surfatante/membrana.

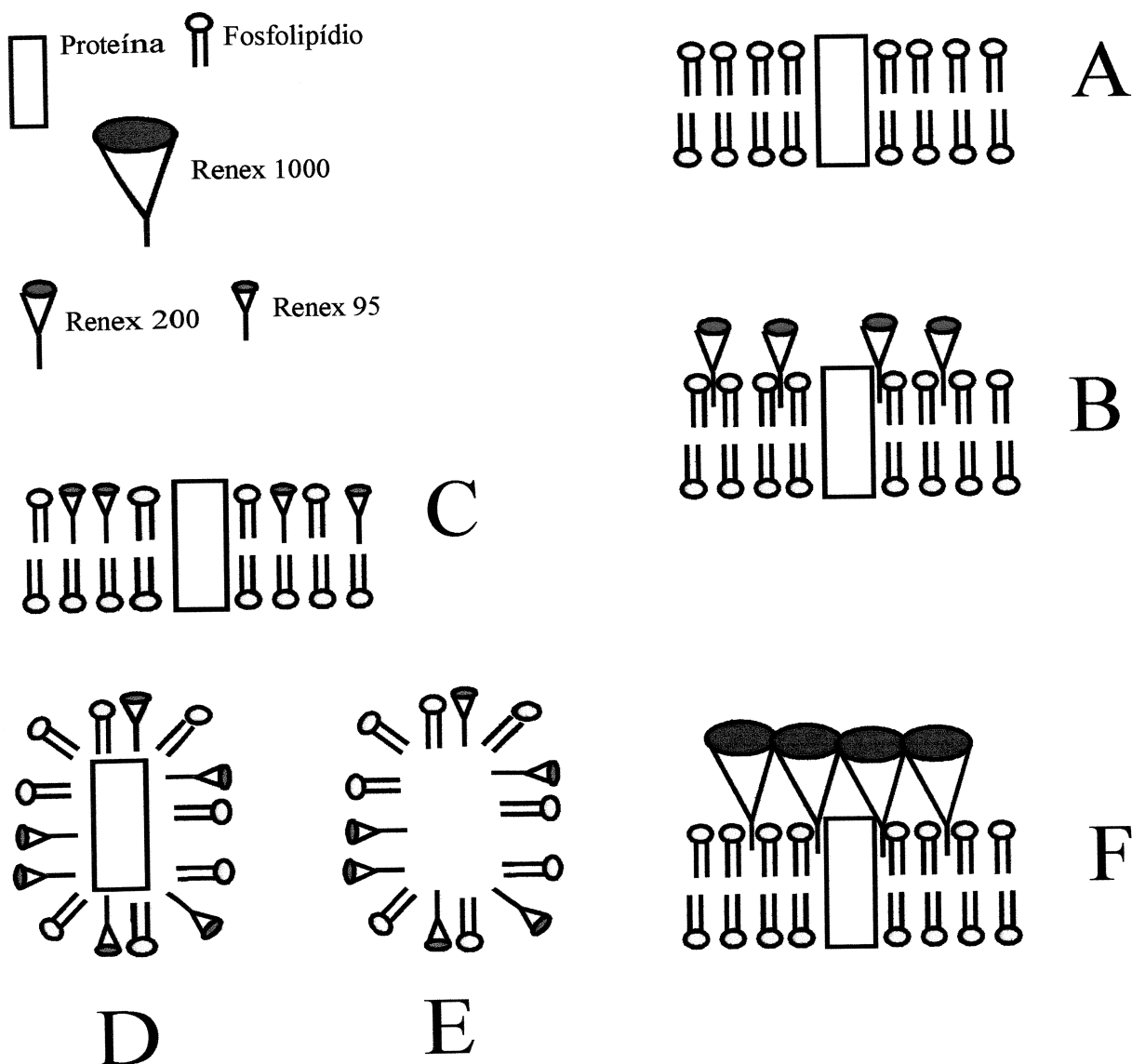
Em primeiro lugar, foi possível observar que as propriedades físico - químicas dos surfatantes, que mudam com a variação do número de moles de OE por mol de nonilfenol, modulam a interação dessas moléculas com as membranas biológicas:

- O Renex 95, que é a molécula mais hidrofóbica estudada, penetra mais profundamente nas membranas, e em concentrações acima da CMC chega a romper a membrana do eritrócito causando hemólise (Figura 26). Esse efeito hemolítico do Renex 95 em altas concentrações é o comportamento mais característico dos anfifílicos, que ao romperem a bicamada lipídica (causando a hemólise) formam agregados micelares mistos nos quais as moléculas de fosfolipídios da bicamada se intercalam com moléculas dos surfatantes (Schreier et al., 1986; dePaula & Schreier, 1995). A Figura 32 apresenta uma representação esquemática da interação dos surfatantes da série Renex com membranas biológicas, onde podemos observar em **C**, **D** e **E**, o processo de solubilização de



membranas, por anfífilos (no caso, Renex 95), resultando na formação de micelas mistas com (D) e sem (E) proteínas solubilizadas em seu interior (Neugebauer, 1994).

- O Renex 200 não apresentou atividade hemolítica nem protetora, entretanto essas moléculas penetram na membrana dos eritrócitos. Isso foi demonstrado pela perturbação que ocorre nessas membranas, verificada pela alteração no parâmetro de ordem. Portanto, a fluidez da membrana é modificada pelo Renex 200, apesar de não se observar efeito hemolítico (Figura 32, B).
- O Renex 1000, além de não apresentar atividade hemolítica, mostrou-se um eficiente agente protetor da hemólise hiposmótica. Esse fato pode ser explicado pela presença de uma cabeça polar muito grande que dificulta a penetração das cadeias apolares. Estas se ligam à membrana, perturbam o ordenamento dos lipídios desta, mas não o suficiente para rompê-la. Por outro lado, a cabeça polar, envolve o eritrócito formando uma “capa” que protege a célula da hemólise hiposmótica (Figura 32, F).



**Figura 32** Representação esquemática da interação dos surfatantes da série Renex com membranas biológicas, onde: A é a representação da membrana; B, C e F a do mecanismo proposto da interação dos Renex 95, 200 e 1000 respectivamente com a membrana; e D e E a formação de micela mista após a solubilização da membrana pelo Renex 95.

## 5. Conclusões

1. Os surfatantes da série Renex constituem um bom modelo para o estudo do efeito da variação da cadeia de óxido de etileno na interação surfatante / membrana, pois além da qualidade dos produtos disponíveis, são poucas as séries de surfatantes não - iônicos que atingem o número de 100 moles de óxido de etileno por mol de nonilfenol.
2. O aumento do número de moles de OE por mol de nonilfenol leva a uma diminuição da atividade hemolítica dos surfatantes, levando até a uma proteção da hemólise.
3. O mecanismo de proteção à hemólise observado no Renex 1000 ocorre devido ao envolvimento da célula pelo POE, ancorado a esta por cadeias apolares que se ligam, em número restrito, à bicamada.
4. O Renex 200, liga-se à membrana do eritrócito causando alteração de sua fluidez, mas não apresenta atividade hemolítica.

## 6. Bibliografia

- ANTONINI, E. AND BRUNORI, M. (1971) In: **Haemoglobin and Myoglobin in their Reaction with Ligands**. North-Holland Publishing Company, Amsterdam and London.
- ATTWOOD, D. AND FLORENCE, A.T. (1983) In: **Surfactant Systems - their Chemistry, Pharmacy and Biology**. Chapman and Hall - New York and London.
- BANGHAN, J. A. AND LEA, E. J. A. (1978) The Interaction of Detergents with Bilayer Lipid Membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **511**: 388-396.
- BASSETTI, L.; HANGENDOORN, M. AND TRAMPER, J. (1995) Surfactant-Induced Non-Lethal Release of Anthraquinones from Suspension Cultures of *Morinda citrifolia*. *J. Biotechnol.* **39**:149-55.
- BIELAWSKI, J. (1990) Two Types of Haemolytic Activity of Detergents. *Biochim. Biophys. Acta* **1035**:214-217.
- BRENNER, C.; JAN, G.; CHEVALIER, Y AND WRÓBLEWSKI, 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**:515-23.
- CALDARARU, H.; CARAGHEORGHEOPOL, A.; DIMONIE, M.; DONESCU, D.; DRAGUTAN, I. AND MARINESCU, N. (1992) Structure of Reversed Micelles in the Cyclohexane/Polyoxyethylene (4) Nonylphenol/water System, as Studied by the Spin Probe Technique. *J.Phys.Chem.* **96**:7109-7115.

- CALDARARU, H.; CARAGHEORGHEOPOL, A.; VASILESCU, M.; DRAGUTAN, I. AND LEMMETYINEN, H. (1994) Structure of the Polar Core in Reverse Micelles of Nonionic Poly(oxyethylene) Surfactants, as Studied by Spin Probe and Fluorescence Probe Techniques. *J.Phys.Chem.* **98**:5320-5331.
- CARDAMONE, M.; PURI, N.K.; SAWYER, W.H.; CAPON, R.J. AND BRANDON, M.R. (1994) A Spectroscopic and Equilibrium Binding Analysis of Cationic Detergent-Protein Interactions Using Soluble and Insoluble Recombinant Porcine Growth Hormone. *Biochim. Biophys. Acta* **1220**:71-82.
- CRUTCHFIELD, M.M. AND IRANI, R.R. (1963) Principles and Utility of Nuclear Magnetic Resonance in Structure Determination of Surfactant Chemicals. *J.Am. Oil Chem. Soc.*, **40**:691-694.
- CRUTCHFIELD, M.M.; IRANI, R.R. AND YODER, J.T. (1964) Quantitative Applications of High-Resolution Proton Magnetic Resonance Measurements in the Characterization of Detergent Chemicals. *J.Am. Oil Chem. Soc.* **41**:129-132.
- DEROME, A. E. (1987) In: **Modern NMR Techniques for Chemistry research**. Pergamon Press, Oxford.
- DePAULA, E. (1993) Estudos Espectroscópicos dos Efeitos de Anestésicos Locais Sobre Propriedades Estruturais e Dinâmicas de Membranas Lipídicas. Tese de Doutorado, Departamento de Bioquímica - IB, UNICAMP, Campinas.
- DePAULA, E. AND SCHREIER, S. (1995) Use of a Novel Method for Determination of Partition Coefficients to Compare the Effect of Local Anesthetics on Membrane Structure. *Biochim. Biophys. Acta* . **in press**.
- De VENDITTIS, E.; PALUMBO, G.; PARLATO, G. AND BOCCHINI, V. (1981) A Fluorimetric Method for Estimation of the Critical Micelle Concentration of Surfactants. *Anal. Biochem.* **115**:278-286.
- FORNEY, C.E. AND GLATZ, C.E. (1995) Extraction of Charged Fusion Proteins in Reversed Micelles: Comparison Between Different Surfactant Systems. *Biotechnol. Prog.* **11**:260-4.

- FREZZATTI JR., W. A.; TOSELLI, W. R. AND SCHREIER, S. (1986) Spin Label Study of Local Anesthetic-Lipid Membrane Interactions. Phase Separation of the Uncharged Form and Bilayer Micelization by the Charged form of Tetracaine. *Biochim. Biophys. Acta* **860**: 351-538.
- GREFF JR, R.A. AND FLANGAN, P.W. (1963) The Characterization of Nonionic Surfactants by NMR. *J. Am Oil Chem Soc.* **43**:118-120.
- GRIFFITH, O. H. AND JOST, O. P. (1976) Lipid Spin Label in Biological Membranes. In: **Spin Labelling, Theory and Applications**, (Berliner, L.J. ed.), pp 453-571, Academic Press, New York.
- GRUEN, D. W. R. (1985) A Model for the Chain in Amphiphilic Aggregates. 1. Comparison with a Molecular Dynamics Simulation of a Bilayer. *J. Phys. Chem.* **89**: 146-156.
- HELENIUS, A. AND SÖDERLUND, H. (1973) Stepwise Dissociation of the Semliki Forest Virus Membrane With Triton X-100. *Biochim. Biophys. Acta* **307**:287.
- HELENIUS, A.; MCCASLIN, D.R.; FRIES, E. AND TANFORD, C. (1979) Properties of Detergents. *Meth. Enzymol.* **LVI**:734-749.
- HUBBEL, W. L. AND MCCONNELL, H. M. (1976) Molecular Motion in Biological Membranes. In: **Spin Labeling Theory and Applications**, (Lawrence J. Berliner, ed.) Academic Press - New York, San Francisco, London. 525-558.
- ISOMAA, B.; HAGERSTRAND, H.; PAATERO, G. AND ENGBLOM, A.C. (1986) Permeability Alterations and Antihaemolysis Induced by Amphiphiles in Human Erythrocyte. *Biochim. Biophys. Acta* **860**:510-524.
- KHUANGA, U.; SELINGER, B.K. AND MCDONALD, R. (1976) A Study of Surfactant Micelles With a Fluorescent Probe. *Austral.J.Chem.* **29**:1-12.

- LOIZAGA, B.; GURTUBAY, I. G.; MACARULLA, J. M.; GOÑI, F. M. AND GÓMEZ, J. C. (1979) Membrane Solubilization by Detergents, and Detergent/Protein ratios. *Biochem. Soc. Trans.* **7**:148-150.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARRAH, S. AND RANDALL, R.J. (1951) Protein Measurements with the Folin Phenol Reagent. *J.Biol. Chem.* **193**:265-275.
- MAST, R.C. AND HAYNES, L.V. (1975) The Use of the Fluorescent Probes Perylene and Magnesium 8-Anilinonaphtalene-1-Sulfonate to Determine the Critical Micelle Concentration of Surfactants in Aqueous Solution. *J.Colloid. Interface Sci.* **53(1)**:35-41.
- MAULIK, S.; JANA, P.K. AND MOULIK, S.P. (1995) Biopolymer-Surfactant Interaction. I. Kinetics of Binding of CetyltrimethylAmmonium Bromide with Carboxymethyl Cellulose (No Salt). *Biopolymers* **35**:533-41.
- McGROARTY, J.A.; REID, G. AND BRUCE, A.W. (1994) The Influence of Nonoxynol-9-Containing Spermicides on Urogenital Infection. *J. Urol.* **152(3)**:831-3.
- MEIRELLES, N. C. AND GLASER, M. (1993) The Influence of Surfactants (Tween 80) on Lipid Domains in Erythrocyte Membranes. *11<sup>th</sup> International Biophysics Congress, Budapest, Hungary Abstracts*, p 151.
- MERCK STANDARDS. (1972) E. Merck Publisher. Roelherdruk, p 304.
- MESZLENYI, G.; KORTVELYESSY, G.; JUHASZ, E. AND EROS-LELKES, M. (1991) Determination of the Molecular Mass and Composition of Nonylphenol Poly(ethylene glycol) Ethers by Infrared Spectroscopy. *Acta Chim. Hung.* **128(2)**:179-181.
- MICHEL, M.; DOMPMARTIN, A.; MOREAU, A. AND LEROY, D. (1994) Contact Photosensitivity to Nonoxynol Used in Antiseptic Preparations. *Photodermatol Photoimmunol. & Photomed.* **10(5)**:198-201.

- MUKERJEE, P. AND MYSELS, K.J. (1970) Critical Micelle Concentration of Aqueous Surfactant Systems. *Natt Bull. Standards*, Washington D.C., **36**.
- MYSELS, K. J. AND MUKERJEE, P. (1979) Reporting Experimental Data Dealing with Critical Micelization Concentration (CMC's) of Aqueous Surfactant Systems. *Pure & Appl.Chem.* **51**:1083-1089.
- NEUGEBAUER, J. (1994) A Guide to the Properties and Uses of Detergents in Biology and Biochemistry. Calbiochem-Novabiochem Int., La Jolla.
- OHNISHI, M. AND SAGITANI, H. (1993) The effect of nonionic surfactant structure on hemolysis. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **70(7)**:679-684.
- PORTER, M. R. (1991) In: **Handbook of surfactants**; Chapman & Hall, New York.
- PRATT, R.S. AND COOK, G.M.W. (1979) Solubilization of human erythrocyte membrane glycoproteins by Triton X-100. *Biochem. J.* **179**:299-303.
- RAMOS, L. S. (1991) Interação de Detergentes Não-lônicos com a Membrana Eritrocitária: Estudo Sobre a Ação dos Detergentes da Série Tween. *Tese de Mestrado, Departamento de Bioquímica - IB, UNICAMP, Campinas.*
- RESTAINO, L.; FRAMPTON, E.W.; BLUESTEIN, R.L.; HEMPHILL, J.B. AND REGUTTI, R.R. (1994) Antimicrobial efficacy of a organic acid anionic surfactant against various bacterial strains. *J. Food Prot.* **57**:496-501.
- RYBCZYNSKA, M. AND CSORDAS, A. (1989) Chain Length-Dependent Interaction of Free Fatty Acids with the Erythrocyte Membrane. *Life Sci.* **44**: 625.
- SCHREIER, S.; AMARAL, A.T.; STACCHISSINI, A. S. AND BIANCONI, M. L. (1986) Membrane Effect Upon Thermodynamic (Apparent pK) and Kinetic Properties of Local Anesthetic Analogs. *Bull. Magn. Res.* **8**: 166-171.



- SCHICK, M.J. (1963) Physical chemistry of nonionic detergents. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **40**:680-687.
- SCHONFELDT (1972) In: **Surface Active Ethylene Oxide Adducts**, Pergamon Press, Oxford.
- SEEMAN, P. AND WEINSTEIN J. (1966) I. Erythrocyte Membrane Stabilization by Tranquilizers and Antihistamines. *Biochem. Pharmacol.* **15**: 1737-1752.
- SEEMAN, P. (1966) II. Erythrocyte Membrane Stabilization by Local Anesthetics and Tranquilizers. *Biochem. Pharmacol.* **15**: 1753-1766.
- SEEMAN, P. (1972) Membrane Action of Local Anesthetics and Tranquilizers. *Pharmacol. Rev.* **24**: 583-589.
- SHEIH, P.S. AND FENDLER, J.H. (1976) Proton magnetic resonance investigations of nonionic polyoxyethylene nonylphenol surfactant aggregates in nonpolar solvents. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.1* 1480-1489.
- SHINAGAWA, S.; KAMEYAMA, K. AND TAKAGI, T. (1993) Effect of salt concentration of buffer on the binding of sodium dodecyl sulfate and on the viscosity behavior of the protein polypeptide derived from bovine serum albumin in the presence of the surfactant. *Biochim. Biophys. Acta* **1161**:79-84.
- TANFORD, C.; NOZAKI, Y. AND ROHDE, M.F. (1977) Size and shape of globular micelles formed in Aqueous solution by n-Alkyl polyoxyethylene ethers. *J. Phys. Chem.* **81(16)**:155-160.
- TRÄNGER, D. AND CSORDAS, A. (1987) Biphasic interaction of triton detergents with the erythrocyte membrane. *Biochem. J.* **244**:605-609.
- Van ALSTINE, J.L.; SHARP, K.A. AND BROOKS, D.E. (1986) Critical micelle concentration dependence on head-group size in polyethylene nonionic surfactants. *Colloids Surf.* **17**:115-121.

WEIR, S.S.; FELDBLUM P.J.; ZEKENG, L. AND RODDY, R.E. (1994)  
The use of nonoxynol-9 for protection against cervical gonorrhoea.  
*Am. J. Public Health* **84(6)**:910-4.