 **UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**EFEITOS DA ATRAZINA E DO DUODECIL SULFATO DE SÓDIO SOBRE A
ESTABILIDADE DE ERITRÓCITOS HUMANOS**


Estudante: **Lúbia Cristina Fonseca**
Orientador: **Professor Dr. Nilson Penha-Silva**

UBERLÂNDIA, MG
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

 **UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

EFEITOS DA ATRAZINA E DO DUODECIL SULFATO DE SÓDIO SOBRE A ESTABILIDADE DE ERITRÓCITOS HUMANOS

Estudante: **Lúbia Cristina Fonseca**
Orientador: **Professor Dr. Nilson Penha-Silva**

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Genética e Bioquímica (área de Bioquímica)

UBERLÂNDIA, MG
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

F676e Fonseca, Lúbia Cristina, 1979-
Efeitos da atrazina e do duodecil sulfato de sódio sobre a estabilidade
de eritrócitos humanos [manuscrito] / Lúbia Cristina Fonseca. – 2010

72 f. : Il.

Orientador: Nilson Penha-Silva

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui bibliografia

1. Células – Membranas – Teses – 2. Eritrócitos – Teses – 3. Atrazina
– Teses – 4. Dodecilsulfato de sódio – Teses. I. Penha-Silva, Nilson. II.
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU 576.314

Elaborado pelo sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de Catalogação e Classificação

EFEITOS DA ATRAZINA E DO DUODECIL SULFATO DE SÓDIO SOBRE A ESTABILIDADE DE ERITRÓCITOS HUMANOS

Estudante: **Lúbia Cristina Fonseca**

Comissão examinadora

Presidente: Prof. Dr. **Nilson Penha-Silva** [UFU] (Orientador)
Examinador: Prof. Dr. **Marcelo Matos Santoro** [UFMG]
Examinador: Prof^a Dra. **Maria Goreti de Almeida Oliveira** [UFV]
Examinador: Prof. Dr. **Fábio de Oliveira** [UFU]
Examinador: Prof^a Dra. **Neide Maria da Silva** [UFU]

Data da defesa: 27/05/2010

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas da PGGB para o formato da dissertação foram contempladas.

Prof. Dr. **Nilson Penha-Silva**
Orientador

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e irmãos
e ao meu marido Wagner

AGRADECIMENTOS

A Deus, motivo de fé e esperança em todos os momentos de conquistas e de fracassos em minha vida;

Ao estimado Prof. Dr. Nilson Penha-Silva, pela orientação acadêmica e pelo seu exemplo de humildade, paciência e dedicação aos estudos e à pesquisa científica;

Aos meus amados pais Dorinato Gonçalves da Fonseca e Délia Maria Gonçalves da Fonseca, pela dedicação para que eu pudesse obter mais que uma formação acadêmica, mas uma formação moral;

Aos meus queridos irmãos, Dorinato Fábio Gonçalves Júnior e Alan Carlos Fonseca, pelo amor e respeito que sempre nos uniram;

Ao meu marido, Wagner Naves de Carvalho, e a sua família, pelo amor e incentivo para que eu pudesse concretizar mais esse sonho;

Ao Prof. Dr. Tales Alexandre Aversi-Ferreira, pela iniciação da minha formação científica;

Às amigas Maria Thereza Alves Batista e Mayra Pimenta, pela ajuda oportuna em Goiânia;

Às queridas amigas Letícia Ramos de Arvelos, Rita de Cássia Mascarenhas Netto, Viviane Mendes, Larissa Freitas Rodrigues e Aline Batista Lins, pela contribuição nos experimentos;

Aos amigos Guilherme Santos Duarte Lemos e Mario da Silva Garrote Filho, pela importante ajuda na finalização deste trabalho;

Aos amigos do laboratório, Fernando Vieira Rodrigues, Júnia de Oliveira Costa, Liandra Freitas Márquez Bernardes, Mariana Vaini de Freitas, Morum Bernardino Neto, Rafael Lopes Pena de Sousa, Romeu Paulo Martins Silva e Vanessa Afonso, pelo companheirismo durante essa etapa;

À Profa. Dra. Cinthya Barbosa Firmino, pelo auxílio na preparação das lâminas histológicas no laboratório da Escola Técnica de Saúde da Universidade Federal de Uberlândia;

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia e aos seus respectivos professores, pela minha formação acadêmica;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de doutorado para a realização do trabalho;

A todos os colegas da Escola Estadual João Rezende pela compreensão e incentivo a minha licença e ao meu aprimoramento profissional;

E a todos os outros que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho;

Deixo aqui os meus sinceros agradecimentos.

APOIO

**COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE
NÍVEL SUPERIOR**



FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA (UFU)



SUMÁRIO

| | Página |
|--|--------|
| Abreviaturas | ix |
| Lista de figuras e tabelas | x |
| Apresentação | 1 |
| Capítulo 1 | |
| Fundamentação teórica | 2 |
| A atrazina | 3 |
| O duodecil sulfato de sódio | 6 |
| As membranas biológicas | 7 |
| A estabilidade de eritrócitos | 9 |
| Referências | 11 |
| Capítulo 2 | |
| Influência da concentração de albumina sobre a estabilidade de membrana de eritrócitos humanos | 20 |
| Resumo | 21 |
| Abstract | 22 |
| Introdução | 23 |
| Material e métodos | 25 |
| Coleta das amostras de sangue | 25 |
| Reagentes e equipamentos | 25 |
| Determinação da estabilidade de eritrócitos contra atrazina | 25 |
| Determinação das curvas de hemólise | 26 |
| Análise de eritrócitos por microscopia de luz | 26 |
| Edições de gráficos e análises estatísticas | 26 |
| Resultados e discussão | 27 |
| Conclusões | 34 |
| Referências | 35 |
| Capítulo 3 | |
| Influência da concentração de albumina e da temperatura na lise de eritrócitos humanos pelo detergente duodecil sulfato de sódio | 42 |
| Resumo | 43 |
| Abstract | 44 |
| Introdução | 45 |
| Material e métodos | 47 |
| Coleta das amostras de sangue | 47 |
| Reagentes e equipamentos | 47 |
| Determinação da estabilidade de eritrócitos contra SDS | 47 |
| Determinação do espectro UV-VIS de hemoglobina e sangue total em diferentes concentrações de SDS | 48 |
| Determinação da estabilidade da hemoglobina contra SDS | 48 |
| Determinação das curvas de hemólise | 48 |
| Análises estatísticas | 49 |
| Resultados e discussão | 50 |
| Conclusões | 67 |
| Referências | 68 |

ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------------|---|
| <i>A₁</i> | Absorvância com valor mínimo de hemólise |
| <i>A₂</i> | Absorvância com valor máximo de hemólise |
| <i>A₅₄₀</i> | Absorvância a 540 nm |
| <i>BSA</i> | Albumina bovina sérica |
| <i>D</i> | Agente desnaturante (atrazina ou duodecil sulfato de sódio) |
| <i>D₅₀</i> | Concentração de agente desnaturante que causa 50% de hemólise |
| <i>dD</i> | Variação na concentração do agente desnaturante necessária para promover hemólise |
| <i>HSA</i> | Albumina humana sérica |
| <i>Salina</i> | Solução de NaCl a 0,9 g/dL ou 9 g/L |
| <i>SDS</i> | Duodecil sulfato de sódio |

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

| | Página |
|--------------|--|
| Figura 2.1: | Curva típica apresentada para a dependência da hemólise com a concentração de atrazina 30 |
| Figura 2.2: | Efeito da concentração de albumina bovina sérica sobre a lise de eritrócitos humanos promovida por atrazina 31 |
| Figura 2.3: | Influência da concentração de atrazina na absorvância em 540 nm na presença de diferentes concentrações de BSA 32 |
| Figura 2.4: | Efeitos da atrazina e da BSA em eritrócitos humanos revelada por microscopia óptica (40x) 33 |
| Figura 3.1: | Curva típica de hemólise induzida por concentrações crescentes de SDS 54 |
| Figura 3.2: | Espectros do sangue total sob diferentes concentrações de SDS 55 |
| Figura 3.3: | Curva de hemólise por SDS obtida com os dados interpolados a partir dos espectros de sangue total em diferentes concentrações de SDS 56 |
| Figura 3.4: | Espectros de hemoglobina humana em diferentes concentrações de SDS 57 |
| Figura 3.5: | Dependência de A_{540} da hemoglobina com a concentração de SDS 58 |
| Figura 3.6: | Influência de BSA sobre a hemólise por SDS 59 |
| Figura 3.7: | Influência da concentração de SDS sobre o espectro de BSA 60 |
| Figura 3.8: | Influência da temperatura na hemólise induzida por SDS 61 |
| Figura 3.9: | Dependência de D_{50} com a temperatura 62 |
| Figura 3.10: | Influência da temperatura sobre o espectro da hemoglobina humana 63 |
| Figura 3.11: | Dependência do A_{540} da hemoglobina em 0,9 g/dL de NaCl com a temperatura 64 |
| Tabela 3.1: | Valores de D_{50} e dD (média \pm sd) obtidos para a lise de eritrócitos humanos por SDS em 0.9 g/dL de NaCl e diferentes concentrações de BSA a 37 °C 65 |
| Tabela 3.2: | Valores de D_{50} e dD (média \pm sd) obtidos para a lise de eritrócitos humanos por SDS em 0.9 g/dL de NaCl em diferentes temperaturas 66 |

APRESENTAÇÃO

O conforto e o bem estar da humanidade sempre foram preocupações das pessoas. Porém, o uso indiscriminado de produtos químicos está alterando o ambiente e provocando sérios danos aos seres vivos e a saúde humana.

Dentre esses produtos químicos podemos destacar os defensivos agrícolas como o herbicida atrazina, que é muito usado em culturas de cana de açúcar, milho, sorgo, pinus, abacaxi dentre outras. O princípio ativo desse herbicida é pouco solúvel em água, daí a necessidade da formulação comercial ser constituída por outros produtos que aumentem a sua solubilidade pelas células vegetais, dentre eles os surfactantes, também conhecidos por detergentes.

No presente trabalho estudamos *in vitro*, os efeitos do herbicida atrazina e do detergente duodecil sulfato de sódio sobre eritrócitos humanos. A formulação comercial do herbicida testado é sigilosa e não descreve o detergente utilizado para aumentar a sua solubilidade.

O capítulo 1 apresenta uma fundamentação teórica sobre os efeitos do herbicida atrazina no ambiente e em seres vivos. Esse capítulo também contém uma revisão sobre os efeitos do detergente duodecil sulfato de sódio em pesquisas biológicas, além de uma revisão sobre a estrutura e a estabilidade de membranas biológicas usando os eritrócitos como células modelos.

O capítulo 2 apresenta o estudo da influência da concentração de albumina sobre a estabilidade de membrana de eritrócitos humanos na presença do herbicida atrazina.

O capítulo 3 apresenta o estudo da influência da concentração de albumina e da temperatura na lise de eritrócitos humanos pelo detergente duodecil sulfato de sódio.

CAPÍTULO 1

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A ATRAZINA

A agricultura é a base de subsistência para a população humana. A produção agrícola sempre foi afetada pelo aparecimento de agressores como ervas daninhas, insetos e patógenos. Desse modo, tornou-se necessário o uso de defensivos contra essas pragas agrícolas.

Apesar dos agrotóxicos elevarem a produção agrícola pelo aumento da produtividade e da diminuição dos custos, esses produtos e seus metabólitos podem colocar em risco o ambiente e a saúde humana [HAPEMAN *et al.*, 2003]. Esses produtos têm sido encontrados como poluentes de águas subterrâneas [FAVA *et al.*, 2005] e superficiais [GAYNOR *et al.*, 1992], nos solos [CRAVEN e HOY, 2005] e na atmosfera [DUYZER, 2003].

O Brasil é, atualmente, um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo e as intoxicações por estas substâncias estão aumentando tanto entre os trabalhadores rurais que as manipulam quanto entre pessoas que se contaminam através dos alimentos.

Os herbicidas do grupo das triazinas compreendem cerca de 30% da produção mundial de agrotóxicos [CABRAL *et al.*, 2003], dentre eles destaca-se o herbicida atrazina, que tem sido muito utilizado nos últimos 30 anos em todo o mundo [ISLAM *et al.*, 2002], principalmente nos Estados Unidos [BARR *et al.*, 2007], no Brasil e na Europa, onde seu uso já foi proibido em alguns países [SASS e COLANGELO, 2006].

A atrazina, 1-cloro-3-etilamino-5-isopropilamino-2,4,6-triazine, é um herbicida da classe toxicológica IV, pouco tóxico aos seres vivos segundo o valor de DL₅₀, que é maior que 5000 mg/kg. Quanto ao potencial de periculosidade ambiental (PPA), Portaria Normativa número 84 de 15 de outubro de 1996, que se baseia nos parâmetros de bioacumulação, persistência, transporte, toxicidade a diversos organismos, potencial mutagênico, teratogênico e carcinogênico, é considerado muito perigoso ao ambiente, classe II. Por esse motivo, o limite de atrazina aceitável na água para consumo humano é de 2 µg/L segundo a Portaria número 518 de 25 de março de 2004.

Esse herbicida é seletivo, de ação sistêmica, usado no controle pré- e pós-emergente de ervas daninhas nos cultivos de cana-de-açúcar, milho, sorgo,

abacaxi, pinus, dentre outros, e nas laterais de rodovias e estradas de ferro para o combate de gramas e de ervas daninhas. Para se tornar ativa, a atrazina deve ser dissolvida em água e adjuvantes para ser absorvida pelas raízes e folhas segundo o controle pré-emergente ou pós-emergente. No controle pré-emergente, o herbicida é absorvido pelas radículas e translocado pelo xilema para as folhas ainda sob o solo. Assim que as folhas emergem e recebem a luz solar iniciam-se as reações que irão levar a planta daninha à morte. Se o controle pré-emergente não for suficiente, o herbicida é pulverizado diretamente nas folhas, onde penetra rapidamente e atua por contato causando a morte do vegetal. A seletividade desse herbicida pelas plantas cultivares ocorre devido às reações de destoxificação, como a conjugação, desalogenação e desalquilação, que metabolizam a atrazina em compostos que não serão danosos para aquelas plantas [VIDAL, 1997]

A atrazina pertence ao grupo de herbicida C1 (inibidores do fotossistema II), que compreende compostos que atuam na membrana do cloroplasto durante a fase luminosa da fotossíntese, mais especificamente no transporte de elétrons [CHRISTOFFOLET *et al.*, 2004]. Esse mecanismo ocorre porque o herbicida atrazina bloqueia a atividade da quinona B na proteína D₁ nas membranas da tilacóide no cloroplasto. A quinona B é um receptor de dois elétrons, que quando encaixada no local apropriado em D₁ recebe dois elétrons da quinona A. Assim, quinona B reduzida pode então transferir os elétrons para outros transportadores até atingir o fotossistema I. Os herbicidas triazinas, como a atrazina também conseguem se encaixar, ao menos em parte, no mesmo local de ligação da quinona, na proteína D₁. Assim, cessa o fluxo de elétrons no fotossistema II, afetando as moléculas de clorofila, que continuam captando energia solar e tornando clorofilas altamente energéticas, denominadas clorofilas tripletes. As clorofilas tripletes podem reagir diretamente com os lipídios de membrana ou com o oxigênio formando radicais de oxigênio. Ambas as reações podem causar lipoperoxidação, destruição da membrana celular e das organelas e morte do vegetal [VIDAL, 1997]. Desse modo, as plantas tratadas com esse herbicida apresentam clorose foliar, inibição do crescimento e morte [COUTINHO *et al.*, 2005].

A atrazina é um herbicida que possui baixa reatividade e solubilidade (33 mg/L), por isso é facilmente detectada no monitoramento de solos [MELI *et al.*, 1992], águas subterrâneas e águas superficiais como rios, riachos e lagos [NELSON *et al.* 2001]. Seus resíduos e metabólitos podem ser encontrados nesses locais após longo período de aplicação [MELI *et al.*, 1992]. A meia-vida da atrazina varia em função das condições ambientais e das características do solo. Segundo Gaynor e colaboradores [1992], o tempo de meia vida varia de 20 a mais de 100 dias, sendo a degradação desse composto realizada por microrganismos. Muitos produtos de degradação desse herbicida são encontrados em frutas e vegetais [TORRES *et al.*, 1996].

Muitos estudos têm sido realizados com o intuito de verificar os possíveis danos da atrazina e de seus resíduos em seres humanos e em outros animais.

Estudos em seres humanos mostraram que a atrazina é um potente interruptor endócrino que aumenta a expressão da enzima aromatase em alguns tipos de câncer. Esse mecanismo está envolvido com a inibição da enzima fosfodiesterase pela atrazina não havendo degradação de cAMP. O aumento nos níveis de cAMP ativa a expressão da enzima aromatase, que age como mediadora da aromatização de andrógenos em estrógenos, aumentando assim a produção de estrogênio [FAN *et al.*, 2007]. A atrazina também foi associada a um aumento de 8,4 vezes os riscos de câncer de próstata em homens que trabalhavam com esse herbicida em San Gabriel, Louisiana, EUA [MACLENNAN *et al.* 2002; SASS, 2003].

A exposição oral aguda (14 dias ou menos) em animais experimentais produziu alterações imunológicas, endócrinas, reprodutivas e prejuízo ao seu desenvolvimento [BABIC-GOMERAC *et al.*, 1989; COOPER *et al.*, 2000; CUMMINGS *et al.*, 2000; FRIEDMANN, 2002; INFURNA *et al.*, 1988; NAROTSKY *et al.*, 2001; RAYNER *et al.*, 2004; RAYNER *et al.*, 2005; ROONEY *et al.*, 2003; ROWE *et al.*, 2006; SIMIĆ *et al.*, 1994; STOKER *et al.*, 1999].

A exposição oral intermediária (15 a 365 dias) e crônica em animais também produziu alterações imunológicas, endócrinas, reprodutivas, prejuízo ao seu desenvolvimento, além de mudanças em vários outros sistemas [CANTEMIR *et al.*, 1997; COOPER *et al.*, 1996; COOPER *et al.*, 2000; CURÍĆ *et al.*, 1999; DESI, 1983; ELDRIGDE *et al.*, 1994; FRIEDMANN, 2002; GOJMERAC *et al.*,

1996; LAWS *et al.*, 2000; PINTÉR *et al.*, 1990; STOKER *et al.*, 2000; TRENTACOSTE *et al.*, 2001; VOS e KRAJNC, 1983; WETZEL *et al.*, 1994].

O DUODECIL SULFATO DE SÓDIO

O duodecil sulfato de sódio (SDS) é um detergente aniônico cuja fórmula é: $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{11}\text{OSO}_3^-\text{Na}^+$. As principais características físicas desse composto são: massa molar de 288,38 g/mol; densidade de 1,1 g/cm³ a 20 °C; ponto de fusão de 204-207 °C; ponto de ebulição de 380 °C e solubilidade em água de 250 g/L a 20 °C.

O SDS tem ampla utilização em pesquisas científicas que envolvem o estudo de diversos processos bioquímicos, tais como: desnaturação de proteínas [TANFORD, 1968; MOOSAVI-MOVAHEDI, 2005; LIU *et al.*, 2007], extração de proteínas [BRENNER *et al.*, 1995; SEDON *et al.*, 2004], formulação de géis (SDS-PAGE) para a realização de eletroforese de proteínas [WEBER e OSBORN, 1969; ZHANG *et al.*, 2005], além da solubilização de membranas biológicas [HELENIUS e SIMONS, 1975].

Esse detergente e também vários outros têm sido muito estudados na interação de membranas, principalmente as membranas de eritrócitos [BIELAWISKI, 1990, RODI *et al.*, 2008; SÁNCHEZ *et al.*, 2007; VIVES *et al.*, 1999]. Essas moléculas podem se ligar às membranas e afetar as suas propriedades.

Muitos mecanismos de lise de eritrócitos ainda não são bem compreendidos. A indução de hemólise por surfactantes depende de muitos parâmetros: tipo de surfactante [ISOMAA, 1979], concentrações do surfactante e dos eritrócitos [SHALEL *et al.*, 2002a], componentes e força iônica da solução [SHALEL *et al.*, 2002b]. A hemólise induzida por surfactantes pode ser explicada por dois mecanismos: lise osmótica e solubilização da membrana [BIELAWISKI, 1990; ISOMAA, 1979; MAHER e SINGER, 1984; SHALEL *et al.*, 2002b]. Em altas concentrações de surfactante, acima da concentração micelar crítica, predomina o mecanismo de solubilização com a formação de micelas mistas contendo surfactantes e componentes da membrana [JONES, 1999]. O mecanismo de lise osmótica ocorre quando as concentrações de surfactantes são baixas. Nesse processo, as moléculas de surfactantes se intercalam na membrana. A

permeabilidade da membrana é alterada, permitindo assim, a entrada de água e lise do eritrócito [BIELAWISKI, 1990; ISOMAA, 1979]. Acredita-se que pelo mecanismo osmótico, a taxa de hemólise seja lenta e pelo mecanismo de solubilização, seja rápida [RIDEAL e TAYLOR, 1958].

O mecanismo predominante de hemólise por SDS é o de solubilização. Nos eritrócitos, há uma predominância de carga negativa na face externa da membrana plasmática devido a presença da glicoproteína Glicoforina A. Em solução salina, há uma redução das cargas negativas da superfície da membrana que favorece a agregação das moléculas de SDS. Desse modo, o efeito da hemólise deixa de ser osmótico e torna-se um efeito de solubilização [SHALEL *et al.*, 2002b].

AS MEMBRANAS BIOLÓGICAS

Todas as células, sejam elas procarióticas ou eucarióticas (animais e vegetais), possuem uma estrutura delimitante denominada de membrana plasmática [CAMPBELL, 2000].

As células eucarióticas também possuem seu interior compartimentalizado por membranas, as quais delimitam as organelas. É devida à compartimentalização de ambientes celulares ou intracelulares que ocorrem as diversas reações bioquímicas que mantêm as funções celulares normais e o organismo em harmonia [LODISH *et al.*, 2003; ALBERTS *et al.*, 2008].

Segundo o modelo do mosaico fluido [SINGER e NICOLSON, 1972], as membranas plasmáticas são estruturas constituídas por uma bicamada lipídica onde estão inseridas muitas proteínas.

Os lipídios das membranas são moléculas anfipáticas e estão dispostos em dupla camada, sendo que as porções polares dos lipídios ficam expostas para o meio aquoso, seja o meio citoplasmático ou o meio extracelular; já que as porções apolares dos lipídios se dirigem umas para as outras no interior da bicamada [SINGER e NICOLSON, 1972; BOON e SMITH, 2002]. Os lipídios que constituem a membrana são fosfolipídios, esfingolipídios e esteróis [CASCIO, 2005].

Quanto maior a quantidade de esteróis, menor é a fluidez e maior é a rigidez da membrana devido ao núcleo rígido do anel esteróide, o qual diminui a liberdade de rotação das ligações carbono-carbono [MURRAY e GRANNER, 2002].

Além dos esteróis, a relação entre as concentrações de ácidos graxos saturados e insaturados nos fosfolípidos também influencia na fluidez e rigidez da membrana plasmática. Quanto maior a concentração de ácidos graxos saturados, maior é a rigidez e menor é a fluidez da membrana devido às interações de van der Waals entre as cadeias alinhadas das caudas hidrofóbicas dos fosfolípidos. Por sua vez, uma concentração maior de ácidos graxos insaturados *cis*-configurados diminui a rigidez e aumenta a fluidez da membrana [MURRAY e GRANNER, 2002].

A temperatura também é um fator que influencia a fluidez ou a rigidez das membranas biológicas. Em temperaturas baixas, ocorre pouca movimentação dos lipídios, configurando uma forma paracristalina da membrana [NELSON e COX, 2008].

O anel esteróide tende a controlar o grau de fluidez das membranas de acordo com a temperatura. Em baixas temperaturas, o anel esteróide previne o empacotamento ordenado dos lipídios aumentando assim a fluidez da membrana. Mas acima da temperatura de transição térmica sólido-líquido, o anel esteróide atua de forma a reduzir a fluidez diminuindo a liberdade de rotação das ligações carbono-carbono dos ácidos graxos. Dessa forma, os esteróis possuem a capacidade de influenciar a fluidez e a rigidez das membranas [NELSON e COX, 2008].

As proteínas da membrana plasmática se dispõem de duas formas: mergulhadas na bicamada (proteínas intrínsecas) ou associadas à superfície interna ou externa da bicamada (proteínas extrínsecas) [LAGUE *et al.*, 2001].

As membranas plasmáticas são estruturas assimétricas, pois as duas monocamadas não possuem a mesma composição de lipídios, glicídios e proteínas [DI *et al.*, 2006]. Os glicídios encontram-se na face externa associados a proteínas (glicoproteínas) e a lipídios (glicolipídios) [ROBERTSON, 1957; ROBERTSON, 1960].

As membranas são estruturas semipermeáveis, pois desempenham funções de transporte de moléculas lipossolúveis e água [AGRE, 2006], de íons, através de canais específicos [GODBERG *et al.*, 2004], e de gases como o oxigênio e o gás carbônico [WANG *et al.*, 2007].

Além de transporte, as membranas possuem as funções de catálise, recepção e transmissão de sinais [CAMPBELL, 2000].

Outras características importantes das membranas são a continuidade e a resistência à tração [CAMPBELL, 2000]. A continuidade reside no fato de estas estruturas nunca apresentarem bordas livres ou descontinuidades. A resistência à tração ocorre devido às interações de van der Waals entre as caudas dos fosfolipídios entre si e entre essas caudas e as proteínas constituintes da membrana [CAMPBELL, 2000].

A ESTABILIDADE DE ERITRÓCITOS

A estabilidade osmótica de eritrócitos é um teste bem estabelecido, eficaz e de baixo custo [CUNHA *et al.*, 2007; DE FREITAS *et al.*, 2008; PENHA-SILVA *et al.*, 2007; PENHA-SILVA *et al.*, 2008; DE FREITAS *et al.*, 2010].

Esse teste avalia a concentração necessária de um determinado agente para causar 50% de lise dos eritrócitos em uma determinada solução a uma determinada temperatura. Para realizar esse cálculo são construídos gráficos dos valores de absorvância obtidos pela leitura da hemoglobina liberada durante a lise dos eritrócitos em função das concentrações do agente que promove essa lise.

Os gráficos são ajustados a equação de Boltzmann, cuja fórmula é:

$$A_{540} = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(D - D_{50})/dD}} + A_2 \quad (1.1),$$

onde A_1 e A_2 são os respectivos valores das leituras da absorvância mínima e máxima da lise dos eritrócitos, D é a concentração do agente, D_{50} é a concentração do agente que causa 50% de hemólise, dD é a variação da concentração do agente na transição sigmoidal entre A_1 e A_2 .

A escolha de eritrócitos como modelo de membranas biológicas é devido à facilidade de obtenção e manipulação dessas células. O rompimento de suas

membranas pode ser monitorado pela leitura da absorvância da hemoglobina liberada em um comprimento de onda fixo que pode ser 540 nm.

Desse modo, o teste de estabilidade osmótica de eritrócitos é um teste de baixo custo, pois não é necessária a utilização de kits dispendiosos, porém é bastante confiável.

REFERÊNCIAS

AGRE, P. The aquaporin water channels. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 3, n. 1, p. 5-13, 2006.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M. **Molecular Biology of the Cell**. 5th ed. New York: Garland, 2008, 1392p.

BABIC-GOJMERAC, T.; KNIEWALD, Z.; KNIEWALD, J. Testosterone metabolism in neuroendocrine organs in male rats under atrazine and deethylatrazine influence. **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 33, n. 1, p.141-146, 1989.

BARR, D.B.; PANUWET, P.; NGUYEN, J.V.; UDUNKA, S.; NEEDHAM, L.L. Assessing exposure to atrazine and its metabolites using biomonitoring. **Environmental Health Perspectives**, v.115, n.1, p. 1474-1478, 2007.

BIELAWISKY, J. Two types of haemolytic activity of detergents. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1035, p. 214-217, 1990.

BOON, J.M.; SMITH, B.D. Chemical control of phospholipid distribution across bilayer membranes. **Medicinal Research Reviews**, v. 22, n. 3, p. 251-281, 2002.

BRENNER, C.; JAN, G.; CHEVALIER, Y.; WROBLEWSKI H. Evaluation of the efficacy of zwitterionic dodecyl carboxybetaine surfactants for the extraction and the separation of mycoplasma membrane protein antigens. **Analytical Biochemistry**, v. 224, p. 515-523, 1995.

CABRAL, M.F.; SOUZA, D.; ALVES, C.R.; MACHADO, S.A.S. Estudo do comportamento eletroquímico do herbicida ametrina utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada. **Eclética Química**, v. 28, n. 2, p. 11-47, 2003.

CAMPBELL, M.; FARRELL, S.O. **Biochemistry**. 6th ed. (Local de publicação) Books Cole. 2007, 832p.

CANTEMIR, C.; COZMEI, C.; SCUTARU, B.; NICOARA, S.; CARASEVICI, E. Protein expression in peripheral lymphocytes from atrazine chronically intoxicated rats. **Toxicology Letters**, v. 93, p. 87-94, 1997.

CASCIO, M. Connexins and their environment: effects of lipids composition on ion channels. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 1711, n. 2, p. 142-153, 2005.

CHRISTOFFOLET, P.J.; OVEREJO, R.F.L.; CARVALHO, J.C. **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 2. ed., Campinas: Associação Brasileira de Ação à Resistência de Plantas aos Herbicidas, 2004.

COOPER, R.L.; STOKER, T.E.; GOLDMAN, J.M.; PARRISH, M.B; TYREY, L. Effect of atrazine on ovarian function in the rat. **Reproductive Toxicology**, v. 10, n. 4, p. 257-264, 1996.

COOPER, R.L.; STOKER, T.E.; TYREY, L.; GOLDMAN, J.M.; MCELROY, W.K. Atrazine disrupts the hypothalamic control of pituitary-ovarian function. **Toxicological Sciences**, v. 53, p. 297-307, 2000.

COUTINHO, C.F.B.; TANIMOTO, S.T.; GALLI, A.; GARBELLINI, G.S.; TAKAYAMA, M.; AMARAL, R.B.; MAZO, L.H.; AVACA, L.A.; MACHADO, S.A.S. Pesticidas: Mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Pesticidas: ecotoxicologia e meio ambiente**, v. 15, p. 65-72, 2005.

CRAVEN, A.; HOY, S. Pesticide persistence and bound residues in soil-regulatory significance. **Environmental Pollution**, v. 133, p. 5-9, 2005.

CUMMINGS, A.M.; RHODES, B.E.; COOPER, R.L. Effect of atrazine on the implantation and early pregnancy in 4 strains of rats. **Toxicological Sciences**, v. 58, p. 135-143, 2000.

CUNHA, C.C.; ARVELOS, L.R.; COSTA, J.O.; PENHA-SILVA, N. Effects of glycerol on the thermal dependence of the stability of human erythrocytes. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 39, p. 341-347, 2007.

CURÍC, S.; GOJMERAC, T.; ZURIC, M. Morphological changes in the organs of gilts induced with low-dose atrazine. **Veterinarsky Arhiv**, v. 69, n.3, p. 135-148, 1999.

DE FREITAS, M.V.; NETTO, R.C.M.; DA COSTA HUSS, J.C.; DE SOUZA, T.M.T.; COSTA, J.O.; FIRMINO, C.B.; PENHA-SILVA, N. Influence of aqueous

crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. **Toxicology In Vitro**, v. 22, p. 219-224, 2008.

DE FREITAS, M.V.; OLIVEIRA, M.R.; SANTOS, D.F., NETTO, R.C.M.; FENELON, S.B.; PENHA-SILVA, N. Influence of the use of statin on the stability of erythrocyte membranes in multiple sclerosis. **Journal of Membrane Biology**, doi: 10.1007/s00232-010-9232-y (In press), 2010.

DESI, I. Neurotoxicological investigation of pesticides in animal experiments. **Neurobehavioral Toxicology and Teratology**, v. 5, p. 503-515, 1983.

DI, L.; LIU, W.; LIU, Y.; WANG, J.Y. Effect of asymmetric distribution of phospholipids ghost membrane from rat blood on peroxidation induced by ferrous ion. **FEBS Letters**, v. 580, p. 685-690, 2006.

DUYZER, J. Pesticide concentrations in air and precipitation in the Netherlands. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 5, n. 4, p. 77N-80N, 2003.

ELDRIDGE, J.C.; FLEENOR-HEYSER, D.G.; EXTROM, P.C.; WETZEL, L.T.; BRECKENRIDGE, C. B. ; GILLIS, J.H.; LUEMPERT III, L.G.; STEVENS, J.T. Short-term effects of chlorotriazines on estrus in female Sprague-Dawley and Fischer 344 rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 43, p.155-167, 1994.

FAN, W.; YANASE, T.; MORINAGA, H.; GONDO, S.; OKABE, T.; NOMURA, M.; KOMATSU, T.; MOROHASHI, K. I.; HAYES, T. B.; TAKAYANAGI, R.; NAWATA, H. Atrazine-induced aromatase expression is SF-1 dependent: implications for endocrine disruption in wildlife and reproductive cancers in humans. **Environmental Health Perspectives**, v. 115, n. 5, p. 720-727, 2007.

FAVA, L.; ORRÙ, M.A.; CROBE, A.; CARACCILO, A.B.; BOTTONI, P.; FUNARI, E. Pesticide metabolites as contaminants of groundwater resources: assessment of the leaching potential of endosulfan sulfate, 2,6-diclorobenzoic acid 3,4-dichloroaniline 2,4-dichlorophenol and 4-chloro-2methylphenol. **Microchemical Journal**, v. 79, n. 1-2, p. 207-211, 2005.

FRIEDMANN, A.S. Atrazine inhibition of testosterone production in rat males following peripubertal exposure. **Reproductive Toxicology**, v. 16, p. 275-279, 2002.

GAYNOR, J.D.; MACTAVISH, D.C.; FINDLAY, W.I. Surface and subsurface transport of atrazine and alchlor from a Brookdton clay loam under continuous corn production. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 23, n. 2, 240-245, 1992.

GOJMERAC, T.; KARTAL B.; CURÍĆ S.; ZURIĆ, M.; KUSEVIĆ, S.; CVETNIĆ, C. Serum biochemical changes associated with cystic ovarian degeneration in pigs after atrazine treatment. **Toxicology Letters**, v. 85, n. 1, p. 9-15, 1996.

GOLDBERG, G.S., VALIUNAS, V.; BRINK, P.R. Selective permeability of gap junction channels. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 1662, n. 1-2, p. 96-101, 2004.

HAPEMAN, C.J.; MCCONNELL, L.L.; RICE, C.P.; SADEGHI, A.M.; SCHMIDT, W.F.; MCCARTY, G.W.; STARR, J.L.; RICE, P.J.; ANGIER, J.T.; HARMAN-FETCHO, J.A. Current United States department of agriculture-agricultural research service research on understanding agrochemical fate and transport to prevent and mitigate adverse environmental impacts. **Pest Management Science**, v. 59, n. 6-7, p. 681-690, 2003.

HELENIUS, A.; SIMONS, K. Solubilization of membranes by detergents. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 415, p. 29-79, 1975.

INFURNA, R.; LEVY, B.; MENG, C.; YAU, E.; TRAINA, V.; ROLOFSON, G.; STEVENS, J.; BARNETT, J. Teratological evaluations of atrazine technical, atrazine herbicide, in rats and rabbits. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 24, p. 307-319, 1988.

ISLAM, M.O.; HARA, M.; MIYAKE, J. Induction of P-glycoprotein, glutathione-S-transferase and cytochrome P450 in rat liver by atrazine. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 12, n. 1, p. 1-6, 2002.

ISOMAA, B. Interactions of surface-active alkyltrimethylammonium salts with the erythrocyte membrane. **Biochemical Pharmacology**, v. 28, p. 975- 980, 1979.

JONES, M.N. Surfactants in membrane solubilisation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 177, p. 137-159, 1999.

LAGUE, P.; ZUCKERMANN, M.J.; ROUX, B. Lipid-Mediated Interactions between Intrinsic Membrane Proteins: Dependence on Protein Size and Lipid Composition. **Biophysical Journal**, v. 81, n. 1, p. 276-284, 2001.

LAWS, S.C.; FERREL, J.M.; STOKER, T.E.; SCHMID, J.; COOPER, R.L. The effects of atrazine on female Wistar rats: An evaluation of the protocol for assessing pubertal development and thyroid function. **Toxicological Sciences**, v. 58, p. 366-376, 2000.

LODISH, H.; BERK, A.; MATSUDAIRA, P.; KAISER, C.A.; KRIEGER, M.; SCOTT, M.P.; ZIPURSKY, S.L.; DARNELL, J. **Molecular Cell Biology**. 5th ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2003.

MACLENNAN, P.A.; DELZELL, E.; SATHIAKUMAR, N.; MYERS, S.L.; CHENG, H.; GRIZZLE, W.; CHEN, V.W.; WU, X.C. Cancer incidence among triazine herbicide manufacturing workers. **Journal of Occupation and Environmental Medicine**, v. 44, p. 1048-1058, 2002.

MAHER, P.; SINGER, S.J. Structural changes in membranes produced by the binding of small amphipathic molecules. **Journal of Biochemistry**, v. 23, n. 2, p. 232- 240, 1984.

MELI, G.; BAGNATI, R.; FANELLI, R.; BENFENATTI, E.; AIROLDI, L. Metabolic profile of atrazine and Nnitrosoatrazine in rat urine. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 48, n. 5, p. 701-708, 1992.

MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K. Membranas: estrutura, montagem e função. In: Granner, D.K.; Mayes, P.A.; Rodwell, V.W. **Haper's Biochemistry**. 9^a ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2002.

NAROTSKY, M.G.; BEST, D.S.; GUIDICI, D.L.; COOPER, R.L. Strain comparisons of atrazina- induced pregnancy loss in the rat. **Reproductive Toxicology**, v. 15, p. 61-69, 2001.

NELSON, D.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 5th ed New York: W. H. Freeman, 2008, 1263p.

NELSON, H. LIN, J. FRANKENBERRY, M. **Drinking water exposure assessment for atrazine and various chlorotriazine and hidroxy-triazine degrates**. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency, 2001.

PENHA-SILVA, N.; ARVELOS, L.R.; CUNHA, C.C.; AVERSI-FERREIRA, T.A.; GOUVÊA-E-SILVA, L.F.; GARROTE-FILHO, M.S.; FINOTTI, C.J.; BERNARDINO-NETO, M.; DE FREITAS REIS, F.G. Effects of glycerol and sorbitol on the thermal dependence of the lysis of human erythrocytes by ethanol. **Bioelectrochemistry**, v. 73 p. 23-29, 2008.

PENHA-SILVA, N.; FIRMINO, C.B.; DE FREITAS REIS, F.G.; DA COSTA HUSS, J.C.; DE SOUZA, T.M.T.; DE FREITAS, M.V.; NETTO, R.C.M. Influence of age on the stability of human erythrocyte membranes. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 128, p. 444-449, 2007.

PINTÉR, A.; TÖRÖK, G.; BÖRZSÖYI, M.; SURJÁN, A.; CSÍK, M.; KELECSÉNYI, Z.; KOCSIS, Z. Long-term carcinogenicity bioassay of the herbicide atrazine in F344 rats. **Neoplasma**, v. 37, n. 5, p. 533-544, 1990.

RAYNER, J.L.; ENOCH, R.R.; FENTON, S.E. Adverse effects of prenatal exposure to atrazine during a critical period of mammary gland growth. **Toxicological Sciences**, v. 87, n.1, p. 255-266, 2005.

RAYNER, J.L.; WOOD, C.; FENTON, S.E Exposure parameters necessary for delayed puberty and mammary gland development in Long-Evans rats exposed in utero to atrazine. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 195, n. 1, p. 23-34, 2004.

RIDEAL, E.K.; TAYLOR, F.H. On haemolysis and haemolytic acceleration. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character. Royal Society (Great Britain)**, v. 148, n. 933, p. 450-464, 1958.

ROBERTSON, J.D. The cell membrane concept. **The Journal of Physiology**, v. 140, p. 58-59, 1957.

ROBERTSON, J.D. The molecular structure and contact relationship of cell membranes. **Progress in biophysics and biophysical chemistry**, v. 10, p. 344-418, 1960.

RODI, P.M.; TRUCCO, V.M.; GENNARO, A.M. Factors determining detergent resistance of erythrocyte membranes. **Biophysical Chemistry**, v. 135, p. 14-18, 2008.

ROONEY, A.A.; MATULKA, R.A.; LUEBKE, R.W. Developmental atrazine exposure suppresses immune function in male, but not female Sprague-Dawley rats. **Toxicological Sciences**, v. 76, n. 2, p. 366-375, 2003.

ROWE, A.M.; BRUNDAGE, K.M.; SCHAFER, R.; BARNETT, J.B. Immunomodulatory effects of maternal atrazine exposure on male Balb/c mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 214, n. 1, p. 69-77, 2006.

SÁNCHEZ, L.; MARTÍNEZ, V.; INFANTE, M.R.; MITJANS, M.; VINARDELL, M.P. Hemolysis and antihemolysis induced by amino acid-based surfactants. **Toxicology Letters**, v. 169, p. 177-184, 2007.

SASS, J. Letter to the editor: Cancer incidence among tiazine herbicide manufacturing workers. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v. 45, p. 343-344, 2003.

SASS, J.B; Colangelo A. European Union bans atrazine, while the United States negotiates continued use. **International Journal of Occupational and Environmental Health**, v. 12, n. 3, p. 260-267, 2006.

SEDDON, A.M.; CURNOW, P.; BOOTH, P.J. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1666, p. 105-117, 2004.

SHALEL, S.; STREICHMAN, S.; MARMUR, A. Monitoring surfactant-induced hemolysis by surface tension measurement. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 255, p. 265–269, 2002a.

SHALEL, S.; STREICHMAN, S.; MARMUR, A. The mechanism of hemolysis by surfactants: effect of solution composition. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 252, p. 66–76, 2002b.

SIMIĆ, B.; KNIEWALD, J.; KNIEWALD, Z. Effects of atrazine on reproductive performance in the rat. **Journal of Applied Toxicology**, v. 14, n. 6, p. 401-404, 1994.

SINGER, S.J; NICOLSON, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, v. 175, p.720-731, 1972

STOKER, T.E.; LAWS, S.C.; GUIDICI, D.L.; COOPER, R.L. The effect of atrazine on puberty in male Wistar rats: An evaluation in the protocol for the assessment of pubertal development and thyroid function. **Toxicological Sciences**, v. 58, p. 50-59, 2000.

STOKER, T.E.; ROBINETTE, C.L.; COOPER, R.L. Maternal exposure to atrazine during lactation suppresses suckling-induced prolactin release and results in prostatitis in the adult offspring. **Toxicological Sciences**, v. 52, n.1, p. 68-79, 1999.

TORRES, C.M.; PICÓ, Y.; MAÑES, J. Determination of pesticide residues in fruit and vegetables. **Journal of Chromatography**, v. 754, p. 301-331, 1996.

TRENTACOSTE, S.V.; FRIEDMAN, A.S.; YOUKER, R.T.; BRECKENRIDGE, C.B.; ZIRKIN, B.R. Atrazine effects on testosterone levels and androgen-dependent reproductive organs in peripubertal male rats. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 1, p. 142-148, 2001.

VIDAL, R.A. **Herbicidas: Mecanismos de ação e resistência de plantas**. Porto Alegre: Ribas Vidal, 1997.

VIVES, M.A.; INFANTE, M.R.; GARCIA, E.; SELVE, C.; MAUGRAUS, M.; VINARDELL, M.P. Erythrocyte hemolysis and shape changes induced by new lysine-derivate surfactants. **Chemico-Biological Interactions**, v. 118, p. 1-18, 1999.

VOS, J.G.; KRAJNC, E.I. Immunotoxicity of pesticides. **Developments in Toxicology and Environmental Science**, v. 11, p. 229-240, 1983.

WEBER, K.; OSBORN, M. Reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 244, p. 4406- , 1969.

WETZEL, L.T.; LUEMPert, L.G.; BRECKENRIDGE, C.B.; TISDEL, M.O.; STEVENS, J.T.; THAKUR, A.K.; EXTROM, P.J.; ELDRIGE, J.C. Chronic effects of atrazine on estrus and mammary tumor formation in female Sprague-Dawley and Fischer-344 rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 43, p. 169-182, 1994.

ZHANG, L.; XIE, J.; WANG, X.; LIU, X.; TANG, X.; CAO, R.; HU, W.; NIE, S.; FAN, C.; LIANG, S. Proteomic analysis of mouse liver plasma membrane: Use of differential extraction to enrich hydrophobic membrane proteins. **Proteomics**, v. 5, p. 4510-4524, 2005.

CAPÍTULO 2

INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE ALBUMINA SOBRE A ESTABILIDADE DE MEMBRANA DE ERITRÓCITOS HUMANOS NA PRESENÇA DO HERBICIDA ATRAZINA

RESUMO

INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE ALBUMINA SOBRE A ESTABILIDADE DE MEMBRANA DE ERITRÓCITOS HUMANOS NA PRESENÇA DO HERBICIDA ATRAZINA

Este trabalho avaliou a influência *in vitro* da albumina sobre a estabilidade de eritrócitos humanos na presença da preparação comercial do herbicida atrazina. As curvas de natureza sigmoideal observadas para a dependência entre os valores de absorvância a 540 nm e os valores da concentração de atrazina, em solução de NaCl a 9 g/L, foram caracterizadas pelo ponto intermediário (D_{50}) e pela amplitude da transição (dD). A incorporação de 1 g/L de albumina sérica bovina (BSA) deslocou a curva de transição da lise dos eritrócitos humanos para a direita, com o aumento em D_{50} e dD . Acima de 25 g/L de BSA, a curva de transição de lise perdeu sua natureza sigmoideal e assumiu uma dependência linear com o aumento na concentração de atrazina. Avaliações por microscopia de luz mostraram que a incorporação da BSA foi também associada à formação de um precipitado cristalino que é, provavelmente, a atrazina. Os sítios de ligação hidrofóbicos da albumina são certamente responsáveis pelo efeito de proteção desta proteína, com a remoção do detergente usado na formulação do produto e a atenuação da natureza cooperativa da hemólise. No entanto, mesmo com a suplementação de albumina, uma transição linear de hemólise também ocorreu com o aumento da concentração de atrazina.

Palavras-chave: Albumina, Atrazina, Eritrócitos, Estabilidade de membrana

ABSTRACT

INFLUENCE OF THE ALBUMIN CONCENTRATION ON THE STABILITY OF MEMBRANES OF HUMAN ERYTHROCYTES AGAINST THE HERBICIDE ATRAZINE

This work evaluated the *in vitro* influence of albumin on the stability of human erythrocytes against the herbicide atrazine present in a commercially available preparation. The sigmoidally shaped curves, observed for the dependence between absorbance at 540 nm and the atrazine concentration in 9 g/L NaCl solution, were characterized by the midpoint (D_{50}) and amplitude of the transition (dD). Incorporation of 1 g/L bovine serum albumin (BSA) shifted the lysis transition of human erythrocytes to the right, with increases in D_{50} and dD . Above 25 g/L BSA, the lysis transition lost its sigmoidally-shaped nature and assumed a linear dependence with increase in the atrazine concentration. Light microscopy evaluations showed that incorporation of BSA was also associated to formation of a crystalline precipitate that is probably atrazine. The hydrophobic binding sites of albumin are surely responsible for the protective effect of this protein, with removal of the detergent used in the formulation of the product and attenuation of the cooperative nature of hemolysis. However, even with supplementation of albumin, a linear transition of hemolysis also occurs with increasing concentration of atrazine.

Key Words: Albumin, Atrazine, Erythrocytes, Membrane stability

INTRODUÇÃO

A atrazina, 1-cloro-3-etilamino-5-isopropilamino-2,4,6-triazina, é um herbicida seletivo do grupo químico das triazinas, que tem sido muito utilizado nos Estados Unidos nos últimos 30 anos, mas não em muitos países europeus, onde sua utilização foi proibida [ISLAM *et al.*, 2002].

Devido à sua ampla utilização e baixa reatividade e solubilidade [MELI *et al.*, 1992], a atrazina é facilmente detectada no solo e em depósitos de água subterrâneas e superficiais. A meia-vida da atrazina varia de 20 a cerca de 100 dias, e seus resíduos e metabolitos podem ser encontrados por longos períodos após sua aplicação [GAYNOR *et al.*, 1992]

Muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de investigar os possíveis danos que a atrazina e seus resíduos podem apresentar nos seres humanos e em outros animais. A atrazina é lipofílica, tem uma baixa massa molar e pode ser passivamente difundido através das membranas biológicas [BREITZKA *et al.*, 1997], sendo rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal e distribuído para o fígado, rins e outros tecidos [DONNA *et al.*, 1989] três horas após a ingestão oral [STOKER e COOPER, 2007]. No cérebro, a atrazina e seus metabolitos atingem um valor máximo dois dias após a exposição, sendo lentamente eliminada [COBAN e FILIPOV, 2007]. No fígado, a atrazina é convertida pelo citocromo P₄₅₀ em três compostos: 2-cloro-4-etilamino-6-amino-1,3,5-triazina; 2-cloro-4-amino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina e diamino-cloro-triazina [HANIOKA *et al.*, 1999].

A toxicidade oral da atrazina, tanto aguda como crônica, foi estudada em diversos trabalhos. Em ambas as situações, os principais alvos da toxicidade desse composto foram os sistemas endócrino e reprodutivo [WETZEL *et al.*, 1994].

Em animais de laboratório, breve exposição oral (14 dias ou menos) produziu efeitos endócrinos, reprodutivos e no desenvolvimento [BABIĆ-GOJMERAC *et al.*, 1989; COOPER *et al.*, 2000; CUMMINGS *et al.*, 2000; FRIEDMANN *et al.*, 2002; INFURNA, *et al.*, 1988; NAROTSKY *et al.*, 2001; PODDA *et al.*, 1997; RAYNER *et al.*, 2004; ROWE *et al.*, 2006; SIMIĆ *et al.*, 1994; STOKER *et al.*, 1999]. Já a exposição oral intermediária (15 a 365 dias) em

animais de laboratório resultou em efeitos reprodutivos, imunológicos e vários outros efeitos sistêmicos [CANTEMIR *et al.*, 1997; COOPER *et al.*, 1996; COOPER *et al.*, 2000; DÉSI *et al.*, 1983; ELDRIDGE *et al.*, 1994; FRIEDMANN *et al.*, 2002; GOJMERAC *et al.*, 1996; LAWS *et al.*, 2000; TRENTACOSTE *et al.*, 2001; WETZEL *et al.*, 1994]. Em humanos, os efeitos da atrazina incluem o risco de indução de câncer [FAN *et al.*, 2007; MACLENNAN *et al.*, 2002].

Os efeitos agudos da atrazina certamente compreendem a interação com elementos do sangue como os eritrócitos. Mas poucos estudos sobre a toxicidade de atrazina têm considerado os seus efeitos sobre os eritrócitos, embora estas células tenham sido utilizadas em estudos sobre os efeitos nocivos de pesticidas [BARAKAT, 2005; BHALLA e AGRAWAL, 1998; METWALLY e FAWZY, 2002; NARENDRA *et al.*, 2007; NASUTI *et al.*, 2003;]. Os glóbulos vermelhos são bons modelos para avaliar o comportamento geral das membranas biológicas devido à facilidade no monitoramento da ruptura da membrana, que está associada à liberação de hemoglobina [CUNHA *et al.*, 2007; DE FREITAS *et al.*, 2008; PENHA-SILVA *et al.*, 2007; PENHA-SILVA, *et al.*, 2008]. A influência de um xenobiótico sobre as células do sangue pode ser afetada pela albumina, que está presente no sangue em uma alta concentração comparada a outros solutos; variando de 35 a 55 g/L. A albumina participa da ligação e transporte de bilirrubina não-conjugada e de ácidos graxos no sangue [MURRAY e GRANNER, 2002]. A albumina também se liga a muitas drogas e pesticidas [KANDAGAL *et al.*, 2006].

A associação de algum componente do pesticida à albumina poderia interferir em sua ação nas membranas celulares. Para testar esta hipótese, analisamos o efeito da concentração de albumina na estabilidade de eritrócitos humanos em presença de uma preparação comercialmente disponível de atrazina.

MATERIAL E MÉTODOS

A execução do presente trabalho foi previamente aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia. Os experimentos foram realizados mediante esclarecimento e consentimento dos voluntários.

2.1. Coletas de amostra de sangue

As amostras de sangue (3 mL) foram coletadas em 8 voluntários do sexo masculino (com idade variando entre 20 e 25 anos, saudáveis, não fumantes, não usuários de drogas de abuso e, especialmente, não consumidores regulares de bebidas alcoólicas), por punção venosa após jejum noturno de 8 a 12 horas. Amostras de sangue foram coletadas em tubos com 50 µL de heparina em ambiente a vácuo (Vacutainer, Becton Dickinson, Juiz de Fora, MG, Brasil).

2.2. Reagentes e equipamentos

O NaCl utilizado (Synth, São Paulo, SP, Brasil), tinha um grau de pureza de 99,5%, o que foi devidamente corrigido na preparação das soluções. A albumina sérica bovina (BSA) utilizada (Sigma, Saint Louis, MO, EUA) tinha 98% de pureza. A atrazina utilizada estava presente no produto comercial Gesaprim 500 (Ciba-Geigy). As determinações de volume foram realizadas com buretas de vidro refratário ou pipetas automáticas (Labsystems, Helsinki, Finlândia). As pesagens dos reagentes foram feitas em uma balança digital (AND, Japão). As incubações foram feitas em banho de água refrigerada (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil). As centrifugações foram feitas em uma centrífuga Hitachi Koki modelo CF15RX II (Hitachinaka, Japão). As leituras de absorvância foram feitas em espectrofotômetro digital (modelo UV-1650PC, Shimadzu, Kyoto, Japão).

2.3. Determinação da estabilidade de eritrócitos na presença de atrazina

Um conjunto de soluções de atrazina nas concentrações entre 0 e 1,5 g/L em solução salina (9 g/L de NaCl) foi preparado para analisar a estabilidade dos eritrócitos sem adição de albumina. A influência da concentração de albumina (0, 1, 25, 50 e 75 g/L) foi analisada usando soluções de atrazina nas concentrações entre 0 e 4,5 g/L, todas em NaCl a 9 g/L.

Baterias de tubos de ensaio (Eppendorf, Brasil) foram preparadas em duplicata, com 1 mL da solução teste e pré-incubadas a 37 °C por 10 minutos. Depois de adicionar 10 µL de sangue, a solução foi homogeneizada e incubada a 37 °C durante 30 minutos. Após centrifugação por 10 minutos a 2000 x *g*, o sobrenadante foi separado e analisado por espectrofotometria visível em 540 nm.

2.4. Determinação de curvas de hemólise

A dependência dos valores de absorvância em 540 nm (A_{540}) com a concentração de atrazina foi ajustada por uma linha de regressão sigmoidal, dada pela equação de Boltzmann,

$$A_{540} = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(D-D_{50})/dD}} + A_2 \quad (2.1),$$

em que A_1 e A_2 representam os valores mínimo e máximo de hemólise, D é a concentração de atrazina, D_{50} representa a concentração de atrazina que promove 50% de hemólise e dD é a variação da concentração de atrazina na transição sigmoidal entre A_1 e A_2 .

2.5. Análise de eritrócitos por microscopia de luz

Os precipitados das frações dos experimentos descritos na Seção 2.3 (10 µL) foram transferidos para lâminas de microscópio, cobertos com lamínulas na ausência de coloração, e analisados por microscopia de luz com aumento de 40x. As imagens foram registradas por uma câmera digital e capturadas por um computador acoplado ao sistema de análise de imagem.

2.6. Edição de gráficos e análises estatísticas

Os cálculos e as análises estatísticas foram feitas com utilização do programa ORIGINPRO 8.0 (Microcal, Northampton, MA, EUA). As linhas de regressão foram consideradas significantes quando P foi menor que 0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Curvas de hemólise de natureza sigmoidal foram obtidas em função da concentração de atrazina sem adição de albumina além daquela presente na amostra de sangue (0,010 mL) e dentro de nossas condições experimentais (1,0 mL de solução contendo 0 a 1,5 g de atrazina/L de salina; incubação em tempo fixo de 30 minutos). Um processo cooperativo, monitorado pela liberação de hemoglobina, ocorreu em uma estreita faixa de concentração do herbicida (**Figura 2.1**).

A atrazina é um composto hidrofóbico, com um baixo limite de solubilidade em água (33 mg/L). A preparação comercial do pesticida utilizado neste trabalho contém atrazina em uma concentração (500 g/L) que é 15.152 vezes superior ao seu limite de solubilidade, certamente devido à presença de um detergente na formulação do produto. O transporte desse herbicida no sistema sanguíneo depende da albumina sérica, que tem uma fraca afinidade de ligação pela atrazina [PURCELL *et al.*, 2001], mas uma alta afinidade de ligação para detergentes aniônicos alifáticos como o duodecanoato e o duodecil sulfato de sódio [KRAGH-HANSEN *et al.*, 2001]. Portanto, a concentração de albumina deve ser um fator importante no sistema.

A incorporação de 1 g/L de albumina sérica bovina (BSA) deslocou a curva de lise dos eritrócitos humanos para a direita, com um aumento no ponto médio (D_{50}) e amplitude (dD) da transição (**Figura 2.2**). Com o novo aumento da concentração de proteína (acima de 25 g/L), a transição de lise perdeu sua natureza sigmoidal e assumiu um comportamento linear em função do aumento na concentração de atrazina. Esse comportamento não é devido ao uso de BSA em vez de albumina sérica humana (HAS), uma vez que estas proteínas diferem apenas em alguns resíduos de aminoácidos e têm estruturas tridimensionais bastante semelhantes [CARTER *et al.*, 1989]. Esse comportamento também não é devido a ocorrência de alterações espectrais associadas à interação da atrazina com a albumina, desde que esta combinação produziu somente variações discretas na absorvância em 540 nm (**Figura 2.3**).

Este efeito é provavelmente devido à capacidade de ligação da albumina ao componente do herbicida responsável pela aceleração cooperativa da lise,

protegendo os eritrócitos dos efeitos líticos desse composto, embora a hemólise ainda ocorra com o aumento na concentração de atrazina. Desde que os detergentes são típicos caotrópicos de membrana e agem por um mecanismo cooperativo [HELENIUS e SIMONS, 1975; SHALEL *et al.*, 2002], é muito razoável admitir que a transição cooperativa de lise promovida pelo aumento da concentração do herbicida é conseqüente à ação do detergente necessariamente presente na formulação do produto. O aumento da concentração de detergente altera progressivamente as propriedades do solvente até um ponto em que há uma fuga maciça de lipídios a partir do espaço interno da membrana para a solução de caotrópicos. A perda da natureza cooperativa do processo devido ao aumento na concentração de albumina é uma conseqüência da ligação do detergente por esta proteína.

Uma vez que o limite de solubilidade da atrazina é pequeno, o seqüestro do detergente pela albumina estaria associado à precipitação do herbicida. De fato, a presença de um precipitado cristalino foi observada com aumento nas concentrações de atrazina e albumina (**Figura 2.4**). A **Figura 2.4** apresenta um painel com imagens de microscopia óptica de eritrócitos humanos em soluções salinas com atrazina e/ou BSA. As séries **A** e **B** referem-se à concentração de BSA de 0 e 75 g/L, respectivamente. Os índices **1** e **2** referem-se a atrazina em concentrações de 0 e 1,5 g/L, respectivamente. Na ausência do herbicida (**série A**), os eritrócitos apareceram como células íntegras. Na ausência de BSA, as hemácias foram rompidas pela preparação de atrazina na concentração de 1,5 g/L (**Figura 2.4A2**), o que está de acordo com os resultados revelados por espectrofotometria, pois a concentração que causou 50% de hemólise foi em torno de 0,81 g/L de atrazina na ausência de BSA (**Figura 2.2**). A incorporação de BSA na solução (**Figura 2.4B1**) mostrou um efeito protetor, com células íntegras aparecendo mesmo em 1,5 g/L de atrazina em soluções com 75 g/L de BSA (**Figura 2.4B2**). A presença de BSA também está associada à formação de cristais que são, provavelmente, de atrazina (**Figura 2.4B2**).

No entanto, a atrazina por si só tem uma ação lítica sobre eritrócitos de ratos [SINGH *et al.*, 2008]. A manifestação desta ação "*in vivo*" foi atribuída ao aumento do estresse oxidativo, com a promoção da lipoperoxidação (LPO) dos componentes da membrana e diminuição do teor de fosfolipídios de membrana e

colesterol [SINGH *et al.*, 2008]. Realmente, a interação da hemoglobina com xenobióticos redox é uma fonte de radicais livres que poderiam causar lipoperoxidação e lise de eritrócitos [CLEMENS *et al.*, 1984; FRENCH *et al.*, 1978; JOHN *et al.*, 2001]. É possível que tal mecanismo oxidativo esteja também operando *in vitro*, porém a atrazina também pode estar agindo por outros mecanismos.

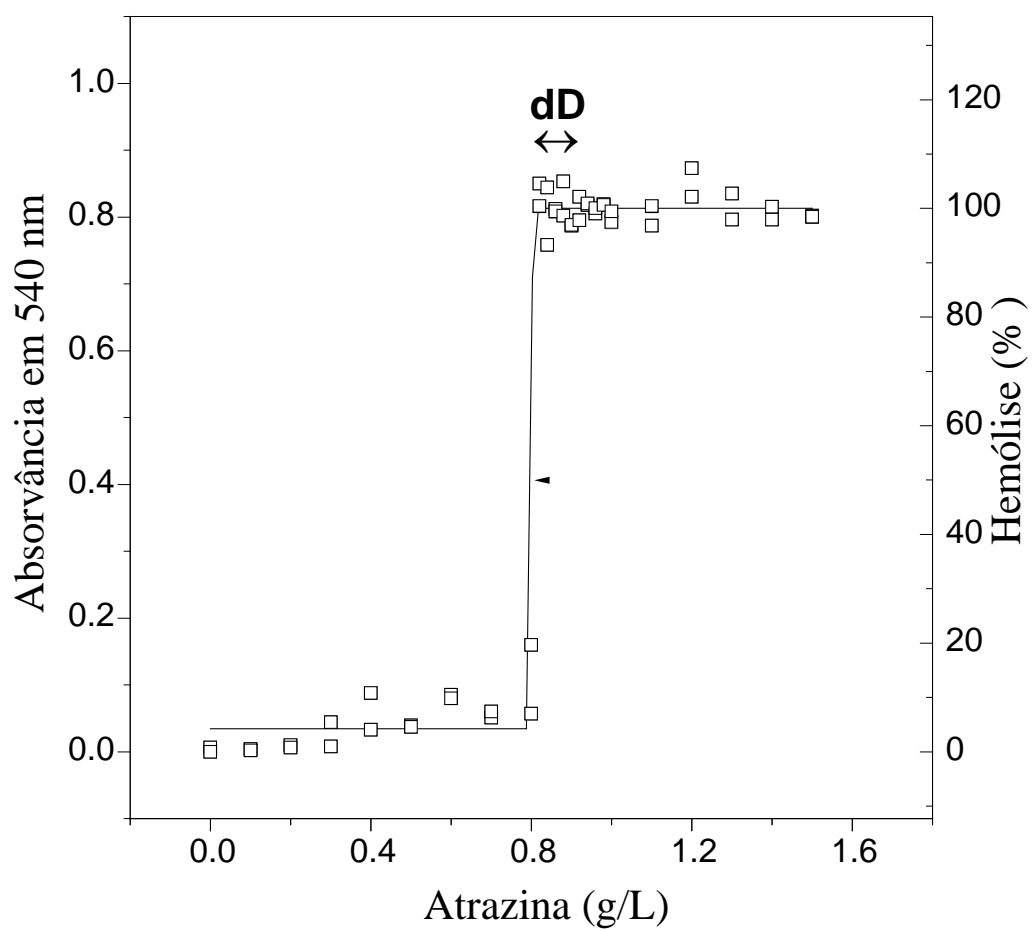


Figura 2.1: Curva modelo apresentada para a dependência da hemólise com a concentração de atrazina da preparação comercial. O ponto intermediário (D_{50}) e da amplitude (dD) da transição estão indicados na figura.

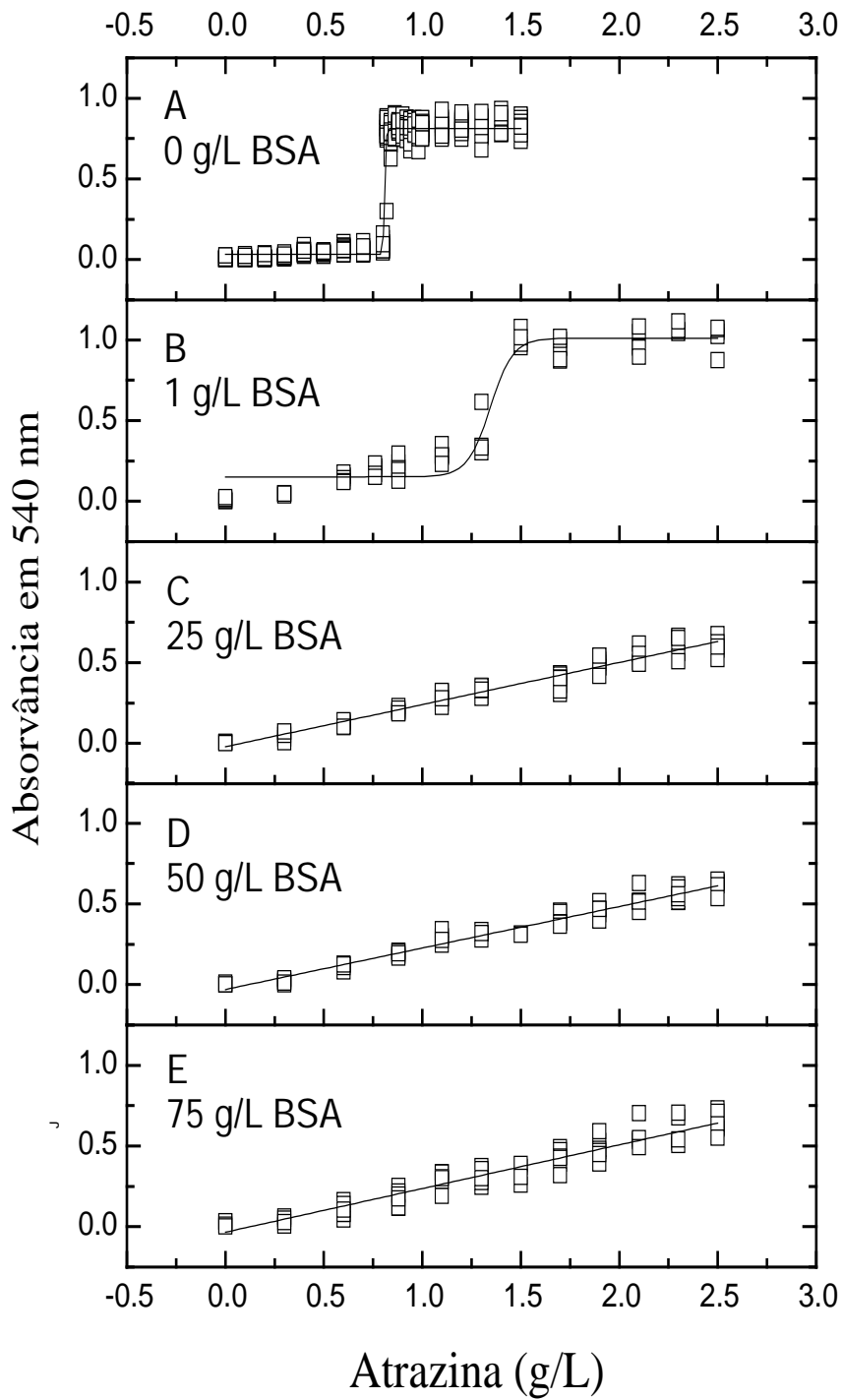


Figura 2.2: Efeito da concentração de albumina bovina sérica sobre a lise de eritrócitos humanos promovida por atrazina. Condições: 9 g/L NaCl e 37 °C.

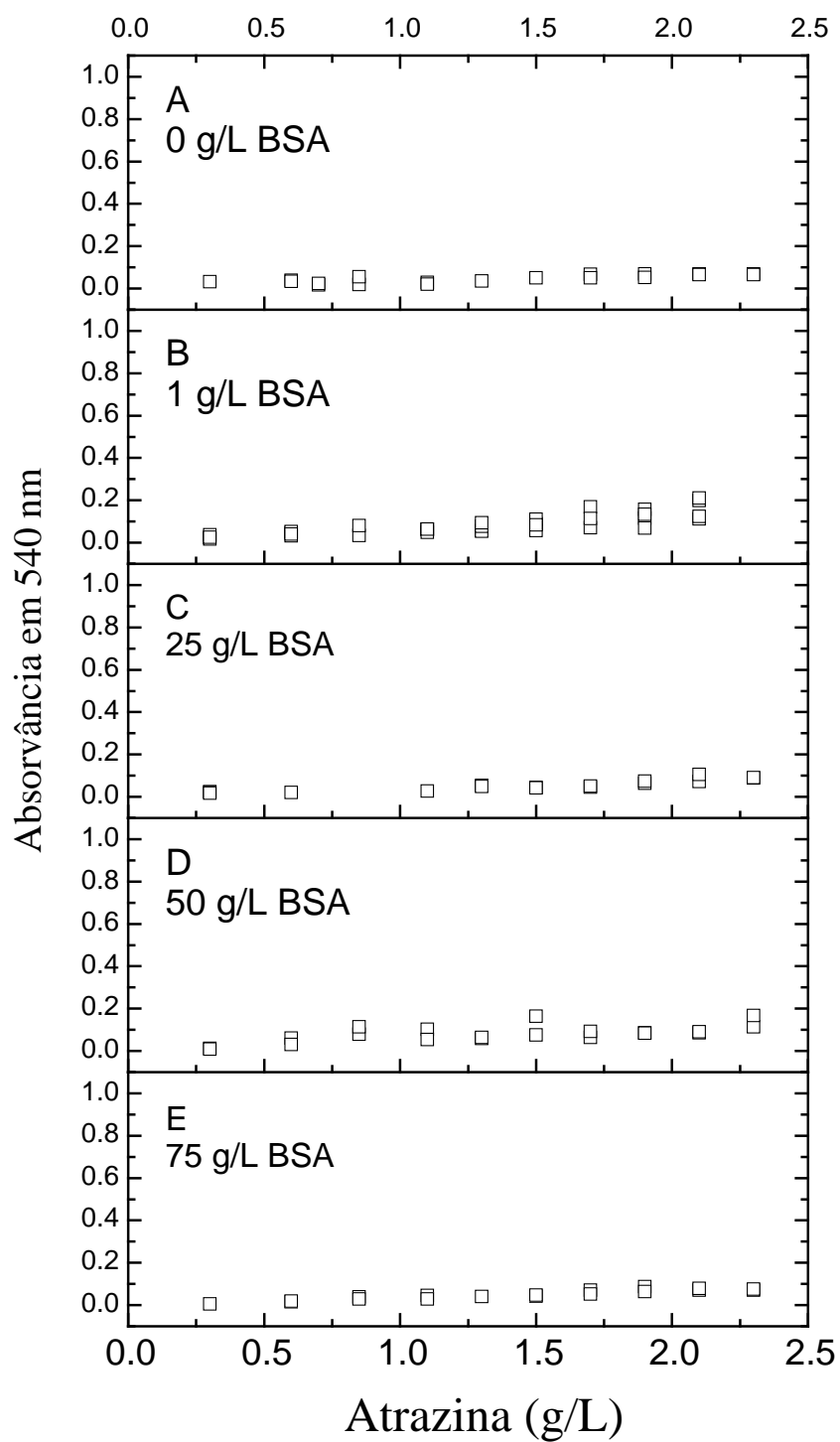
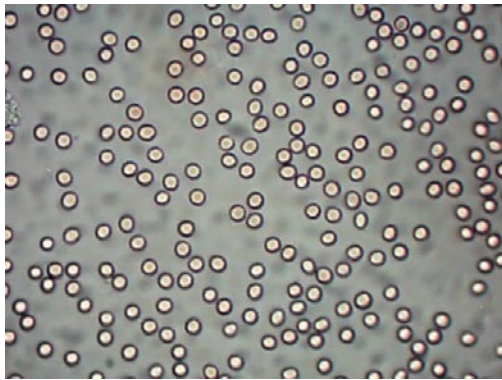


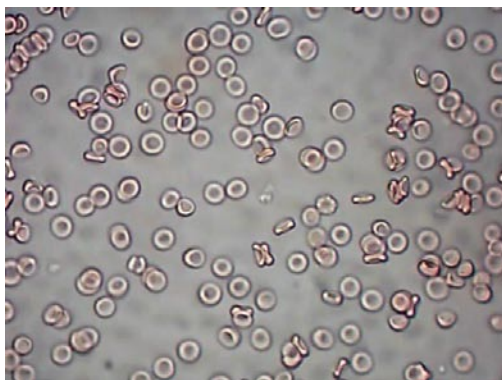
Figura 2.3: Influência da concentração de atrazina na absorvância em 540 nm na presença de diferentes concentrações de BSA na ausência de sangue. Condições: 9 g/L NaCl e 37 °C.



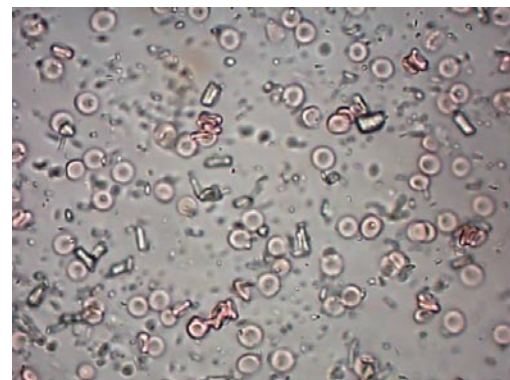
A1



A2



B1



B2

Figura 2.4: Fotomicrografias dos efeitos da atrazina e de BSA em eritrócitos humanos revelada por microscopia óptica utilizando a objetiva de 40x. Na ausência de atrazina e BSA não há hemólise (**A1**). A incorporação de 1,5 g/L de atrazina produziu lise completa dos eritrócitos na ausência de BSA (**A2**). Na presença de 75 g/L de albumina e ausência do herbicida, os eritrócitos apareceram como células discóides (**B1**). Na presença de 75 g/L de BSA e 1,5 g/L de atrazina (**B2**) houve proteção contra lise e formação de um precipitado cristalino que é, provavelmente, atrazina.

CONCLUSÕES

Concentrações de albumina dentro dos níveis fisiológicos dessa proteína no soro são capazes de atenuar o aumento cooperativo na hemólise promovida pela preparação comercial de atrazina *in vitro*, o que provavelmente ocorre pela remoção do detergente utilizado neste produto pela BSA. No entanto, um aumento linear de hemólise ainda ocorre com o aumento da concentração de atrazina.

REFERÊNCIAS

BABIĆ-GOJMERAC, T.; KNIEWALD, Z.; KNIEWALD, J. Testosterone metabolism in neuroendocrine organs in male rats under atrazine and deethylatrazine influence. **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 33, n. 1, p. 141-146, 1989.

BARAKAT, K.K. Effect of certain insecticides on the stabilization and lysis of human and fish erythrocyte. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v. 1, n. 2, p. 195-199, 2005.

BHALLA, P.; AGRAWAL, D. Alterations in rat erythrocyte membrane due to hexachlorocyclohexane (technical) exposure. **Human and Experimental Toxicology**, v. 17, n. 11, p. 638-642, 1998.

BREITZKA, R.L.; SANDRITTER, T.L.; HATZOPOULOS, F.K. Principles of drug transfer into breast milk and drug disposition in the nursing infant. **Journal of Human Lactation**, v. 13, n. 2, p. 155-158, 1997.

CANTEMIR, C.; COZMEI, C.; SCUTARU, B.; NICOARA, S.; CARASEVICI, E. p53 protein expression in peripheral lymphocytes from atrazine chronically intoxicated rats. **Toxicology Letters**, v. 93, n. 2-3, p. 87-94, 1997.

CARTER, D.C.; HE, X.M.; MUNSON, S.H.; TWIGG, P.D.; GERNERT, K.M.; BROOM, M.B.; MILLER, T.Y. Three-dimensional structure of human serum albumin. **Science**, v. 244, n. 4909, p. 1195-1198, 1989.

CLEMENS, M.R.; REMMER, H.; WALLER, H.D. Phenylhydrazine induced lipid peroxidation of red blood cells in vitro and in vivo: monitoring by the production of volatile hydrocarbons. **Biochemical Pharmacology**, v. 33, n. 11, p. 1715-1718, 1984.

COBAN, A.; FILIPOV, N.M. Dopaminergic toxicity associated with oral exposure to the herbicide atrazine in juvenile male C57BL/6 mice. **Journal of Neurochemistry**, v. 100, n. 5, p. 1177-1187, 2007.

COOPER, R.L.; STOKER, T.E.; GOLDMAN, J.M.; PARRISH, M.B.; TYREY, L. Effect of atrazine on ovarian function in the rat. **Reproductive Toxicology**, v. 10, n. 4, p. 257-264, 1996.

COOPER, R.L.; STOKER, T.E.; TYREY, L.; GOLDMAN, J.M.; McELROY, W.K. Atrazine disrupts the hypothalamic control of pituitary-ovarian function. **Toxicological Sciences**, v. 53, n. 2, 297-307, 2000.

CUMMINGS, A.M.; RHODES, B.E.; COOPER, R.L.; Effect of atrazine on the implantation and early pregnancy in 4 strains of rats. **Toxicological Sciences**, v. 58, n. 1, p. 135-143, 2000.

CUNHA, C.C.; ARVELOS, L.R.; COSTA, J.O.; PENHA-SILVA, N. Effects of glycerol on the thermal dependence of the stability of human erythrocytes. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 39, n. 4, p. 341-347, 2007.

DE FREITAS, M.V.; NETTO, R.C.M.; DA COSTA HUSS, J.C.; DE SOUZA, T.M.T.; COSTA, J.O.; FIRMINO, C.B.; PENHA-SILVA, N. Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. **Toxicology In Vitro**, v. 22, n. 1, p. 219-224, 2008.

DÉSI, I. Neurotoxicological investigation of pesticides in animal experiments. **Neurobehavioral Toxicology and Teratology**, v. 5, n. 5, p. 503-515, 1983.

DONNA A.; CROSIGNANI, P.; ROBUTTI, F.; BETTA, P.G.; BOCCA, R.; MARIANI, N.; FERRARIO, F.; FISSI, R.; BERRINO, F. Triazine herbicides and ovarian epithelial neoplasms. *Scandinavian Journal of Work. Environment and Health*, v. 15, n. 1, p. 47-53, 1989.

ELDRIDGE, J.C.; FLEENOR-HEYSER, D.G.; EXTROM, P.C.; WETZELL, L.T.; BRECKENRIDGE, C.B.; GILLS, J.H.; LUEMPert 3rd, L.G.; STEVENS, J.T. Short-term effects of chlorotriazines on estrus in female Sprague-Dawley and Fischer 344 rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 43, n. 2, p. 155-167, 1994.

FAN, W.; YANASE, T.; MORINAGA, H.; GONDO, S.; OKABE, T.; NOMURA, M.; KOMATSU, T.; MOROHASHI, K.; HAYES, T.B.; TAKAYANAGI, R.; NAWATA, H. Atrazine-induced aromatase expression is SF-1 dependent: implications for endocrine disruption in wildlife and reproductive cancers in humans. **Environmental Health Perspectives**, v. 115, n. 5, p. 720-727, 2007.

FRENCH, J.K.; WINTERBOURN, C.C.; CARREL, R.W.. Mechanism of oxyhaemoglobin breakdown on reaction with acetylphenylhydrazine. **Biochemical Journal**, v. 173, n. 1, p. 19-26, 1978.

FRIEDMANN, A.S. Atrazine inhibition of testosterone production in rat males following peripubertal exposure. **Reproductive Toxicology**, v. 16, n. 3, p. 275-279, 2002.

GAYNOR, J.D.; MACTAVISH, D.C.; FINDLAY, W.I. Surface and subsurface transport of atrazina and alachlor from a Brookdton clay loam under continuous corn production. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 23, n. 2, p. 240-245, 1992.

GOJMERAC, T.; KARTAL, B.; CURIĆ, S.; ZURIĆ, M.; KUSEVIĆ, S.; CVETNIĆ, Z. Serum biochemical changes associated with cystic ovarian degeneration in pigs after atrazine treatment. **Toxicology Letters**, v. 85, n. 1, p. 9-15, 1996.

HANIOKA, N.; JINNO, H.; TANAKA-KAGAWA, T.; NISHIMURA, T.; ANDO, M. In vitro metabolism of chlorotriazines: characterization of simazine, atrazine, and propazine metabolism using liver microsomes from rats treated with various cytochrome P450 inducers. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 156, n. 3, p. 195-205, 1999.

HELENIUS, A.; SIMONS, K. Solubilization of membranes by detergents. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 415, n. 1, p. 29-79, 1975.

INFURNA, R.; LEVY, B.; MENG, C.; YAU, E.; TRAINA, V.; ROLOFSON, G.; STEVENS, J.; BARNETT, J. Teratological evaluations of atrazine technical, atrazine herbicide, in rats and rabbits. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 24, n. 3, p. 307-319, 1988.

ISLAM, M.O.; HARA, M.; MIYAKA, J. Miyake. Induction of P-glycoprotein, glutathione-S-transferase and cytochrome P450 in rat liver by atrazine. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 12, n. 1, p. 1-6, 2002.

JOHN, S.; KALE, M.; RATHORE, N.; BHATNAGAR, D. Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 12, n. 9, p. 500-504, 2001.

KANDAGAL, P.B.; ASCHOKA, S.; SEETHARAMAPPA, J.; SHAIKH, S.M.T.; JADEGOUD, Y.; IJARE, O.B. Study of the interaction of an anticancer drug with human and bovine serum albumin: Spectroscopic approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 2, p. 393-399, 2006.

KRAGH-HANSEN, U.; HELLEC, F.; DE FORESTA, B.; LE MAIRE, M.; MØLLER, J.V. Detergents as probes of hydrophobic binding cavities in serum albumin and other water-soluble proteins. **Biophysical Journal**, v. 80, n. 6, p. 2898-2911, 2001.

LAWS, S.C.; FERRELL, J.M.; STOKER, T.; SCHMID, J.; COOPER, R.L. The effects of atrazine on female wistar rats: An evaluation of the protocol for assessing pubertal development and thyroid function. **Toxicological Sciences**, v. 58, n. 2, p. 366-376, 2000.

MACLENNAN, P.A.; DELZELL, E.; SATHIAKUMAR, N.; MYERS, S.L.; CHENG, H.; GRIZZLE, W.; CHEN, V.W.; WU, X.C. Cancer incidence among triazine herbicide manufacturing workers. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v. 44, n. 4, p. 1048-1058, 2002.

MELI, G.; BAGNATI, R.; FANELLI, R.; BENFENATTI, E.; AIROLDI, L. Metabolic profile of atrazine and nitrosoatrazine in rat urine. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 48, n. 5, p. 701-708, 1992.

METWALLY, S.A.; FAWZY, H.M. Effect of permethrin, pirimiphos methyl and bendiocarb on the osmotic resistance of rat erythrocytes. **Egyptian Journal of Hospital Medicine**, v.15, p. 57-64, 2002.

MURRAY, R.K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P.A.; RODWEL, V.W. **Harper's Biochemistry**. 26th edition, Lange Medical Books/McGraw-Hill, New York, USA, 2003.

NARENDA, M.; BHATRACHARYULU, N.C.; PADMAVATHI, P.; VARADACHARYULU, N.C. Prallethrin induced biochemical changes in erythrocyte membrane and red cell osmotic haemolysis in human volunteers. **Chemosphere**, v. 67, n. 6, p. 1065-1071, 2007.

NAROTSKY, M.G.; BEST, D.S.; GUIDICI, D.L.; COOPER, R.L. Strain comparisons of atrazine-induced pregnancy loss in the rat. **Reproductive Toxicology**, v. 15, n. 1, p. 61-69, 2001.

NASUTI, C.; CANATALAMESSA, F.; FALCIONI, G.; GABBIANELLI, R. Different effects of Type I and Type II pyrethroids on erythrocyte plasma membrane properties and enzymatic activity in rats. **Toxicology**, v. 191, n. 2-3, p. 233-244, 2003.

PENHA-SILVA, N.; ARVELOS, L.R.; CUNHA, C.C.; AVERSI-FERREIRA, T.A.; GOUVÊA-E-SILVA, L.F.; GARROTE-FILHO, M.S.; FINOTTI, C.J.; BERNADINHO-NETO, M.; DE FREITAS REIS, F.G. Effects of glycerol and sorbitol on the thermal dependence of the lysis of human erythrocytes by ethanol. **Bioelectrochemistry**, v. 73, n. 1, p. 23-29, 2008.

PENHA-SILVA, N.; FIRMINO, C.B.; DE FREITAS REIS, F.G.; DA COSTA HUSS, J.C.; DE SOUZA, T.M.T.; DE FREITAS, M.V.; NETTO, R.C.M. Influence of age on the stability of human erythrocyte membranes. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 128, n. 7-8, p. 444-449, 2007.

PODDA, M.V.; DERIU, F.; SOLINAS, A.; DEMONTIS, M.P.; VARONI, M.V.; SPISSU, A.; ANANIA, V.; TOLU, E. Effect of atrazine administration on spontaneous and evoked cerebellar activity in the rat. **Pharmacology Research**, v. 36, n. 3, p. 199-202, 1997.

PURCELL, M.; NEAULT, J.F.; MALONGA, H.; ARAKAWA, H.; CARPENTIER, R.; TAJMIR-RIAAHI, H.A. Interactions of atrazine and 2,4-D with human serum albumin

studied by gel and capillary electrophoresis, and FTIR spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1548, n. 1, p. 129-138, 2001.

RAYNER, J.L.; WOOD, C.; FENTON, S.E. Exposure parameters necessary for delayed puberty and mammary gland development in Long-Evans rats exposed in utero to atrazine. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 195, n. 1, p. 23-34, 2004.

ROWE, A.M.; BRUNDAGE, K.M.; SCHAFER, R.; BARNETT, J.B. Immunomodulatory effects of maternal atrazine exposure on male Balb/c mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 214, n. 1, p. 69-77, 2006.

SHALEL, S.; STREICHMAN, S.; MARMUR, A. The mechanism of hemolysis by surfactants: Effect of solution composition. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 252, n. 1, p. 66-76, 2002.

SIMIĆ, B.; KNIEWALD, J.; Kniewald, Z. Effects of atrazine on reproductive performance in the rat. **Journal of Applied Toxicology**, v. 14, n. 6, p. 401-404, 1994.

SINGH, M.; SANDHIR, R.; KIRAN, R. Atrazine-induced alterations in rat erythrocyte membranes: ameliorating effect of vitamin E. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 22, n. 5, p. 363-369, 2008.

STOKER, T.E.; COOPER, R.L. Distribution of ¹⁴C-atrazine following an acute lactational exposure in the Wistar rat. **Reproductive Toxicology**, v. 23, n. 4, p. 607-610, 2007.

STOKER, T.E.; ROBINETTE, C.L.; COOPER, R.L. Maternal exposure to atrazine during lactation suppresses suckling-induced prolactin release and results in prostatitis in the adult offspring. **Toxicological Sciences**, v. 52, n. 1, p. 68-79, 1999.

TRENTACOSTE, S.V.; FRIEDMAN, A.S.; YOUKER, R.T.; BRECKENRIDGE, C.B.; ZIRKIN, B.R. Atrazine effects on testosterone levels and androgen-

dependent reproductive organs in peripubertal male rats. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 1, p. 142-148, 2001.

WETZEL, L.T.; LUEMPFT 3rd, L.G. BRECKENRIGE, C.B.; TISDEL, M.O.; STEVENS, J.L.; THAKUR, A.K.; EXTROM, P.J.; ELDRIDGE, J.C. Chronic effects of atrazine on estrus and mammary tumor formation in female Sprague-Dawley and Fischer-344 rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 43, n. 2, p. 169-182, 1994.

ZUNZAIN, P.A.; GHUMAN, J.; KOMATSU, T.; TSUCHIDA, E. Crystal structural analysis of human serum albumin complexed with hemin and fatty acid. **BMC Structural Biology**, v. 3, n. 6, p. 1-9, 2003.

CAPÍTULO 3

INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE ALBUMINA E DA TEMPERATURA NA LISE DE ERITRÓCITOS HUMANOS PELO DETERGENTE DUODECIL SULFATO DE SÓDIO

RESUMO

INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE ALBUMINA E DA TEMPERATURA NA LISE DE ERITRÓCITOS HUMANOS PELO DETERGENTE DUODECIL SULFATO DE SÓDIO

A estabilidade de eritrócitos humanos contra duodecil sulfato de sódio (SDS) foi avaliada por espectrofotometria na presença de diferentes concentrações de albumina bovina sérica (BSA) e em diferentes temperaturas (27-45 °C). A absorvância em 540 nm (A_{540}) foi correlacionada com a concentração de SDS por regressão sigmoidal, com base na equação de Boltzmann. A estabilidade de eritrócitos foi caracterizada pela concentração de SDS que promoveu 50% de hemólise (D_{50}). O aumento progressivo da concentração de albumina promoveu um aumento em D_{50} . As concentrações de BSA que protegeram contra a lise de eritrócitos não tiveram suas características espectrais alteradas. O efeito protetor da BSA contra a hemólise por SDS foi atribuído à ligação do surfactante aos sítios de ligação hidrofóbicos desta proteína. Os valores de D_{50} diminuíram sigmoidalmente com o aumento da temperatura. Esta tendência, que não foi explicada por mudanças nas propriedades espectrais da hemoglobina, pode ser o resultado de heterogeneidade na população de eritrócitos.

Palavras-chave: Albumina, Eritrócitos, Estabilidade de membrana, Duodecil sulfato de sódio, Surfactantes, Temperatura

ABSTRACT

INFLUENCE OF ALBUMIN CONCENTRATION AND TEMPERATURE ON THE LYSIS OF HUMAN ERYTHROCYTES BY SODIUM DODECYL SULPHATE

The stability of human erythrocytes against sodium dodecyl sulphate (SDS) was assessed spectrophotometrically in the presence of different concentrations of bovine serum albumin (BSA) and at different temperatures (27-45 °C). The absorbance at 540 nm (A_{540}) was correlated with the concentration of SDS by sigmoidal regression, based on the Boltzmann equation. The erythrocyte stability was characterized by the concentration of SDS that promoted 50% of hemolysis (D_{50}). Progressive increases in the concentration of albumin promoted increases in D_{50} . The BSA concentrations that protected erythrocytes against lysis didn't altered its spectral characteristics. The protective effect of BSA against hemolysis by SDS was attributed to binding of surfactant to the hydrophobic binding sites of this protein. The values of D_{50} decreased sigmoidally with the temperature increase. This trend, which was not explained by changes in the spectral properties of hemoglobin, may be the result of heterogeneity in the population of erythrocytes.

Keywords: Albumin, Erythrocytes, Membrane stability, Sodium dodecyl sulphate, Surfactants, Temperature

INTRODUÇÃO

Surfactantes ou detergentes são compostos anfílicos que são classificados como não-iônicos, catiônicos, aniônicos e anfóteros, de acordo com a natureza do seu grupo polar [BHAIRI, 2001; NEUGEBAUER, 1994].

Dentre os detergentes aniônicos destaca-se o duodecil sulfato de sódio (SDS), que é um surfactante largamente utilizado na indústria farmacêutica, para a produção de cosméticos, e também na indústria química, para aumentar a desorção de herbicidas como a atrazina [ABU-ZREIG *et al.*, 1999; SANCHEZ-CAMAZANO *et al.*, 2000].

O SDS é capaz de promover a desnaturação de proteínas [HELENIUS e SIMONS, 1975; LIU *et al.*, 2007; MOOSAVI-MOVAHEDI, 2005; TANFORD, 1968] e causar a lise de eritrócitos [BIELAWISKI, 1990; PARSI *et al.*, 2008; SHALEL *et al.*, 2002a; SHALEL *et al.*, 2002b].

Em soluções salinas, a ação do SDS em eritrócitos tem sido atribuída principalmente à solubilização da membrana e não à lise osmótica. A ocorrência de hemólise foi relatada em concentrações de SDS em torno de 104 μM [BIELAWISKI, 1990].

O plasma tem altas concentrações de albumina, uma proteína importante na ligação e transporte de compostos hidrofóbicos, tais como ácidos graxos, bilirrubina não-conjugada [MURRAY e GRANNER, 2003; ZUNSZAIN *et al.*, 2003], drogas [KANDAGAL *et al.*, 2006] e agentes químicos tóxicos [LI *et al.*, 2009].

A albumina também pode se ligar a SDS e a outras substâncias anfílicas. Isto certamente deve afetar a quantidade disponível do caotrópico para promover hemólise.

Este estudo investiga a influência da concentração de albumina na lise de eritrócitos humanos pelo SDS, através de protocolos previamente descritos na literatura [CUNHA *et al.*, 2007; PENHA-SILVA *et al.*, 2008]. Uma caracterização mais completa deste sistema deve ser muito importante, pois a estabilidade da membrana do eritrócito tem sido amplamente utilizada em estudos sobre envelhecimento e longevidade [GILCA *et al.*, 2008; PENHA-SILVA *et al.*, 2007], doenças [DE FREITAS *et al.*, 2010], ação de produtos naturais [de FREITAS *et al.*, 2008], drogas [de JONG *et al.*, 2006; RABINI *et al.*, 1993] e agentes tóxicos

[DUCHNOWICZ e KOTER, 2003; KARABULUT *et al.*, 2009; KLESZCZYNSKA *et al.*, 2003; NARENDRA *et al.*, 2007].

O calor também é um caotrópico para proteínas [FONSECA *et al.*, 2006] e células [CUNHA *et al.*, 2007; PENHA-SILVA *et al.*, 2008; TSONG e KINGSLEY, 1975]. Esse agente pode afetar a ação caotrópica do SDS em proteínas [LEE *et al.*, 1989]. A influência da temperatura na lise de eritrócitos por SDS também foi investigada neste estudo.

MATERIAL E MÉTODOS

A execução do presente trabalho foi previamente aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia. Os experimentos foram realizados mediante o esclarecimento e o consentimento dos voluntários.

2.1. Coletas de amostra de sangue

As amostras de sangue (3 mL) foram coletadas em 8 voluntárias do sexo feminino (idade entre 20 e 25 anos, saudáveis, não fumantes, não viciadas em drogas de abuso e, especialmente, não consumidoras regulares de bebidas alcoólicas), por punção venosa após jejum noturno de 8 a 12 horas. As amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo 50 µL de heparina em ambiente a vácuo (Vacutainer, Becton Dickinson, Juiz de Fora, MG, Brasil).

2.2. Reagentes e equipamentos

O NaCl utilizado (Synth, São Paulo, SP, Brasil), tinha um grau de pureza de 99,5%, o que foi devidamente corrigido na preparação das soluções. A albumina bovina sérica (BSA) tinha 98% de pureza (Sigma, Saint Louis, MO, EUA). A hemoglobina humana foi obtida de um concentrado de hemácias por lise em água destilada. As medições de volume foram realizadas com buretas de vidro refratário ou pipetas automáticas (Labsystems, Helsinki, Finlândia). As medidas de massa foram feitas em uma balança digital (AND, Japão). As incubações foram feitas em banho de água refrigerada (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil). As leituras de absorvância espectral e as varreduras foram feitas em um espectrofotômetro digital (modelo UV-1650, Shimadzu, Kyoto, Japão). As centrifugações foram realizadas em uma centrífuga modelo Hitachi Koki CF15RX II (Hitachinaka, Japão).

2.3. Determinação da estabilidade de eritrócitos contra SDS

Soluções de SDS em concentrações entre 93,6 e 191 µM em 0,9 g/dL de NaCl (salina) foram preparadas para analisar a estabilidade dos eritrócitos sem adição de albumina. A influência da concentração de albumina (0,02; 0,04; 0,06; 0,08 e 0,1 g/dL) foi analisada usando soluções salinas (0,9 g/dL de NaCl) de SDS

em concentrações entre 93,6 e 274 μM . Concentrações maiores de SDS foram utilizadas para a obtenção de curvas completas de hemólise.

Baterias de tubos de ensaio (Eppendorf, Brasil) foram preparadas em duplicata, com 1 mL da solução teste e pré-incubadas por 10 minutos. Depois do acréscimo de 10 μL de sangue e homogeneização, a solução foi incubada a 37 °C durante 30 minutos. Após a centrifugação por 10 minutos a 2000 x g, o sobrenadante foi separado e analisado por espectrofotometria visível em 540 nm.

2.4. Determinação do espectro UV-VIS de hemoglobina e sangue total em diferentes concentrações de SDS

Foram realizadas varreduras espectrais entre 250 e 700 nm de hemoglobina humana e sangue total em soluções salinas (0,9 g/dL de NaCl) contendo SDS em duas concentração antes (101 e 107 μM) e duas concentrações após (177 e 184 μM) a transição sigmoidal de hemólise.

2.5. Determinação do espectro UV da BSA em diferentes concentrações de SDS

Foram realizadas varreduras espectrais entre 270 e 310 nm de albumina bovina sérica em soluções salinas (0,9 g/dL de NaCl) contendo SDS em diferentes concentrações (0; 100,5; 107,5; 211,5; 218,4; 246,1 e 253,1 μM)

2.6. Determinação da estabilidade da hemoglobina contra SDS

A cada um de um conjunto de tubos de ensaio (Eppendorf, Brasil), todos em duplicata, foi adicionado 1 mL de solução salina (0,9 g/dL de NaCl) de SDS em concentrações entre 50 e 274 μM . Após pré-incubação por 10 minutos, foram adicionados 10 μL de solução de hemoglobina àquelas soluções. Os tubos foram homogeneizados, incubados a 37 °C por 30 minutos e centrifugados por 10 minutos a 2000 x g. Os sobrenadantes foram analisados por espectrofotometria visível em 540 nm.

2.7. Determinação das curvas de hemólise

A dependência dos valores de A540 em função da concentração de SDS foi ajustada por uma linha de regressão sigmoidal, dada pela equação de Boltzmann,

$$A_{540} = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(D-D_{50})/dD}} + A_2 \quad (3.1),$$

em que A_1 e A_2 representam os valores mínimo e máximo de hemólise, D é a concentração de SDS, D_{50} representa a concentração de SDS que causa 50% de hemólise e dD é a variação da concentração de SDS na transição sigmoidal entre A_1 e A_2 .

2.8. Análises estatísticas

Os cálculos e as análises estatísticas foram feitas com o programa OriginPro 8.0 (Microcal, Northampton, MA, EUA). As linhas de regressão foram consideradas significantes quando P foi menor que 0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A **Figura 3.1** mostra uma curva modelo de estabilidade de eritrócitos em função da concentração de SDS na presença de 0,9 g/dL de NaCl a 37 °C. O experimento foi realizado por incubação de eritrócitos humanos em soluções de SDS nas concentrações que permitiram a caracterização da curva de hemólise como uma sigmóide (0 e 190,7 μM). Essa curva de hemólise é caracterizada por uma transição em dois estados (**Figura 3.1**). A transição de lise começa em cerca de 130 e em torno de 160 μM de SDS já há lise completa.

Espectros UV-VIS das soluções foram obtidos em duas concentrações de SDS antes (A_1) e depois (A_2) da transição de hemólise (**Figura 3.2**). De fato, em concentrações de SDS que definem o primeiro e o segundo platôs da sigmóide, os espectros das soluções foram compatíveis com a liberação mínima e máxima da hemoglobina.

A análise de regressão dos valores de A_{540} interpolados nos espectros em função da concentração de SDS (**Figura 3.2**) produziu uma curva de transição sigmoidal (**Figura 3.3**) bastante semelhante aquela da **Figura 3.1**.

Desde que o SDS é um caotrópico e também pode desnaturar proteínas como a hemoglobina e a albumina, foi investigada a influência das concentrações hemolíticas do SDS nas propriedades espectrais UV-VIS destas proteínas. Para excluir a possibilidade da curva de transição mostrada na **Figura 3.1** ser atribuída à ação do surfactante na hemoglobina, espectros UV-VIS de hemoglobina humana também foram obtidos em duas concentrações de SDS antes e em duas concentrações após a transição sigmoidal (**Figura 3.4**). O SDS produziu apenas pequenas alterações na intensidade das bandas de hemoglobina humana (**Figura 3.4**).

Como corolário desta afirmação, foi construída uma curva de dependência de A_{540} da hemoglobina humana em função da concentração do surfactante no intervalo de concentração utilizado para a caracterização completa de hemólise (**Figura 3.5**). Na verdade, houve apenas uma ligeira diminuição dos valores de A_{540} da hemoglobina humana com o aumento da concentração do surfactante. O efeito das concentrações hemolíticas de SDS sobre os valores de A_{540} da hemoglobina foi significativamente associado a uma linha de regressão

decrecente (**Figura 3.5**) com uma inclinação muito pequena (0,000474). Isto significa que no intervalo de concentração de SDS necessário à realização da hemólise não houve mudanças nas características espectrais da hemoglobina que poderiam ser responsáveis pelo comportamento espectral atribuído à hemólise (**Figura 3.1**). De fato, mudanças conformacionais na hemoglobina, com perturbações espectrais, foi reportada apenas em concentrações muito superiores de SDS (acima de 69 mM) [MITJANS *et al.*, 2008].

A influência de BSA na lise de eritrócitos humanos como uma função da concentração de SDS em 0,9 g/dL de NaCl foi mostrada na **Figura 3.6**. A adição de BSA em concentrações de 0,02, 0,04 e 0,06 g/dL deslocou a curva de transição de lise para a direita, com aumento do ponto de meia-transição (D_{50}). Esses valores (média \pm SD) de D_{50} foram mostrados na **Tabela 3.1**. Com a adição de 0,08 e 0,10 g/dL de BSA, o surfactante não produziu hemólise no intervalo de concentração estudado (**Figura 3.6**).

Essa influência de BSA na hemólise induzida por SDS não representa qualquer artefato associado à influência do SDS sobre as propriedades espectrais de BSA, porque o espectro UV-VIS da BSA não foi significativamente perturbado com as concentrações de SDS usadas para produzir a transição completa de hemólise (**Figura 3.7**).

Em baixas concentrações, o SDS causa apenas hemólise [BIELAWISKI, 1990]. Na verdade, houve 50% de hemólise em 148 μ M de SDS a 37 °C (**Figura 3.6A** e **Tabela 3.1**). A condição em que esse experimento (**Figura 3.6A**) foi feito não reflete a concentração de albumina presente no sangue, uma vez que a amostra de sangue (10 μ L) foi diluída em uma solução salina (0,9 g/dL) de SDS (1 mL).

A albumina está presente no sangue em concentrações entre 3,5 e 5,5 g/dL [MURRAY e GRANNER, 2003]. A incorporação de 0,02 a 0,06 g/dL de BSA ao meio de reação causou um deslocamento da curva de hemólise de SDS para a direita (**Figura 3.6B** a **Figura 3.6D**), com aumento dos valores de D_{50} (**Tabela 3.1**). Este comportamento significa que BSA protegeu os eritrócitos da lise por SDS. A albumina pode se ligar a diversos compostos anfifílicos de origem endógena [ZUNZAIN *et al.*, 2003] e exógena [KANDAGAL *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2009], que compreende o agente anfifílico SDS [KRAGH-HANSEN *et al.*, 2001].

A causa do efeito estabilizador da albumina deve ser a ligação do SDS a esta proteína, diminuindo a disponibilidade do detergente para formar micelas. O aumento da concentração de BSA de 0 a 0,06 g/dL diminuiu o efeito cooperativo das moléculas de detergente na lise de eritrócitos. Em concentrações de BSA superiores a 0,06 g/dL (**Figura 3.6E** a **Figura 3.6F**), a disponibilidade de SDS para romper eritrócitos diminuiu de modo que não houve hemólise na faixa de concentração de detergente estudada. Certamente, o aumento da disponibilidade de sítios de ligação para o detergente, com o aumento da concentração de albumina diminuiu a biodisponibilidade do SDS para promover hemólise. Assim, a concentração de albumina deve ser um fator importante no sistema e isso deve ser considerado dentre outros fatores que determinam a resistência da membrana de eritrócitos ao detergente [[RODI et al., 2008](#)].

A temperatura é outra variável que precisa de controle neste tipo de experimento. Como caotrópico, o calor deveria potencializar a hemólise por SDS. O aumento da temperatura deveria promover uma diminuição de D_{50} para SDS, o que de fato ocorreu. A influência da temperatura sobre a hemólise por SDS foi mostrada na **Figura 3.8**. Na verdade, o aumento da temperatura de 27 para 45 °C foi associado a uma migração para a esquerda das curvas de hemólise por SDS, com a diminuição dos valores de D_{50} (**Tabela 3.2**).

A influência da temperatura nos valores de D_{50} associados à hemólise por SDS foi mostrada na **Figura 3.9**. A dependência de D_{50} com a temperatura foi melhor ajustada a uma curva sigmoidal decrescente. A natureza sigmoidal deste ajuste poderia ser conseqüência de mudanças no comportamento espectral da hemoglobina com o aumento da temperatura, pois o calor é um caotrópico também para as proteínas. Para verificar essa hipótese, a dependência do espectro UV-VIS da hemoglobina humana em temperaturas variando de 27 a 45 °C foi estudada (**Figura 3.10**). No entanto, a influência do aumento da temperatura sobre os valores de A_{540} da hemoglobina foi muito pequena, nas condições experimentais utilizadas. Houve uma diminuição significativa, mas muito pequena nos valores de A_{540} com o aumento da temperatura (**Figura 3.11**). Apesar da natureza fraca desta dependência, a equação dessa reta foi utilizada para subtrair o efeito da temperatura sobre a hemoglobina do efeito total associado às curvas de hemólise por SDS em diferentes temperaturas (**Figura**

3.8). Os valores recalculados de D_{50} diferiram dos valores originais apenas além da casa centesimal (resultados não mostrados). Como não houve diferença significativa entre os novos valores calculados e os valores originais de D_{50} , a natureza sigmoideal da curva de dependência de D_{50} com a temperatura deve ter um significado físico específico, não fundamentado em alterações espectrais da hemoglobina.

A ocorrência da diminuição sigmoideal dos valores de D_{50} com a temperatura (**Figura 3.9**) deve significar que nos menores valores de temperatura do intervalo, o sinergismo de ações entre calor e SDS tem um menor impacto sobre a hemólise (primeiro platô). Com um aumento da temperatura, aquele sinergismo é potencializado (região intermediária descendente da sigmóide). Para além dessa região, o sinergismo torna-se mais fraco (segundo platô). Este enfraquecimento do sinergismo entre a ação do calor e do SDS deve ser devido à existência à heterogeneidade na população de eritrócitos reportada na literatura [BIELAWISKI, 1990; JAY e ROWLANDS, 1975]. A existência de células vermelhas do sangue mais resistentes à lise seria a causa do enfraquecimento do sinergismo caotrópico da ação entre calor e SDS no segundo platô da sigmóide. Essa heterogeneidade seria decorrente da composição natural do sangue ou de um efeito estabilizador gerado pela combinação de calor e SDS. A existência de tal efeito estabilizador implica na ocorrência de um dualismo de ação no sistema SDS e calor. Estes agentes são ambos caotrópicos, mas eles podem também afetar a pressão osmótica do meio. Na verdade, mudanças de forma [VIVIES *et al.*, 1999] e ação anti-hemolítica [SÁNCHEZ *et al.*, 2007] têm sido descritas para as interações de alguns surfactantes e eritrócitos.

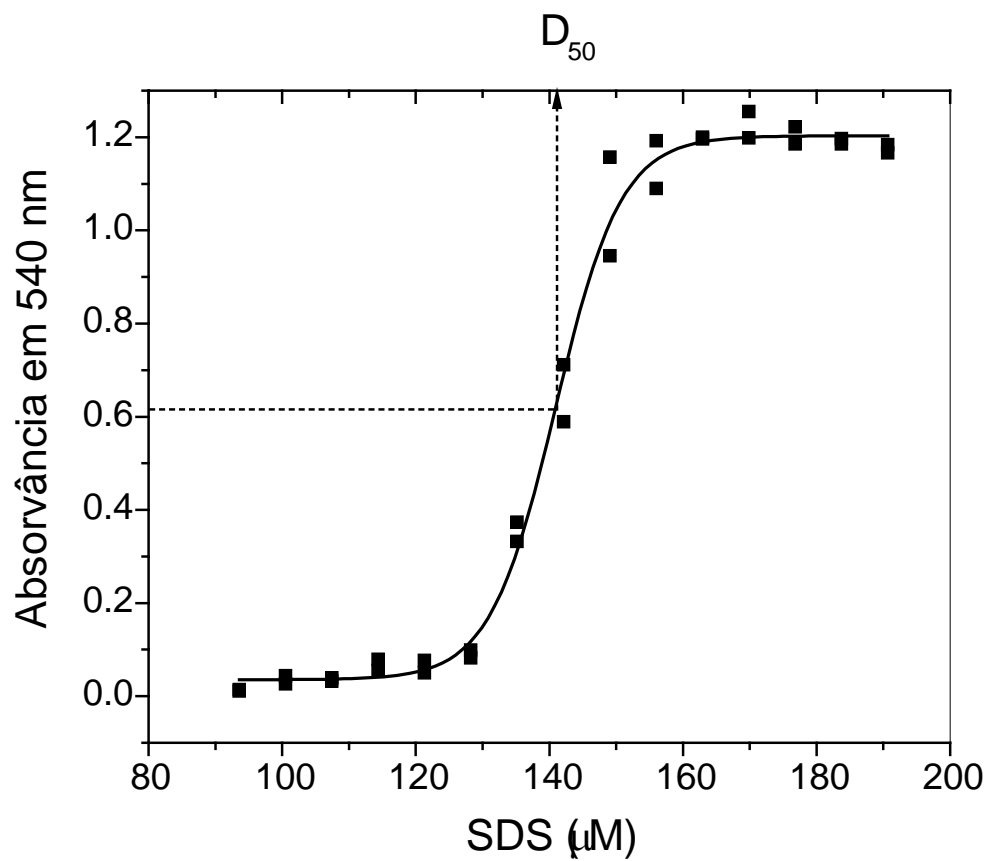


Figura 3.1: Curva típica de hemólise induzida por concentrações crescentes de SDS. Condições: 0,9 g/dL de NaCl e 37 °C.

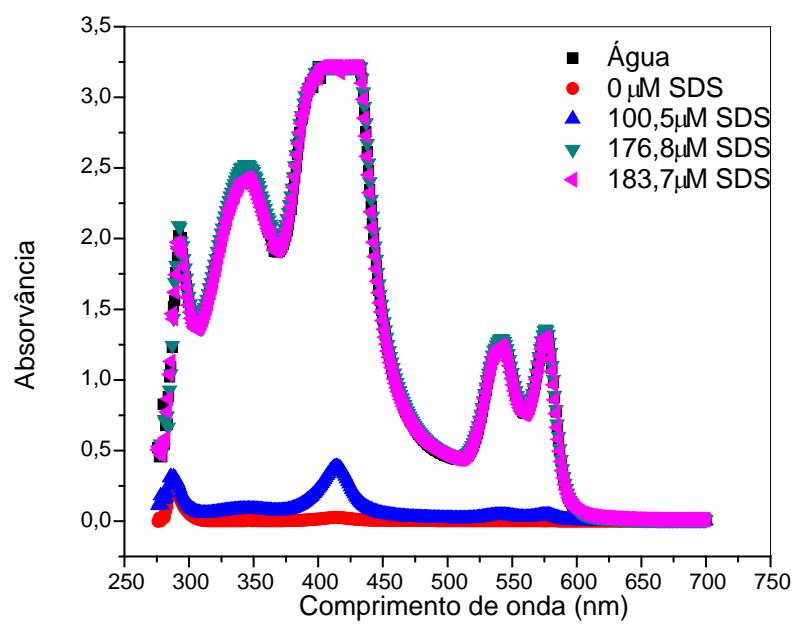


Figura 3.2: Espectros do sangue total sob diferentes concentrações de SDS. Condições: 0,9 g/dL de NaCl e 37 °C

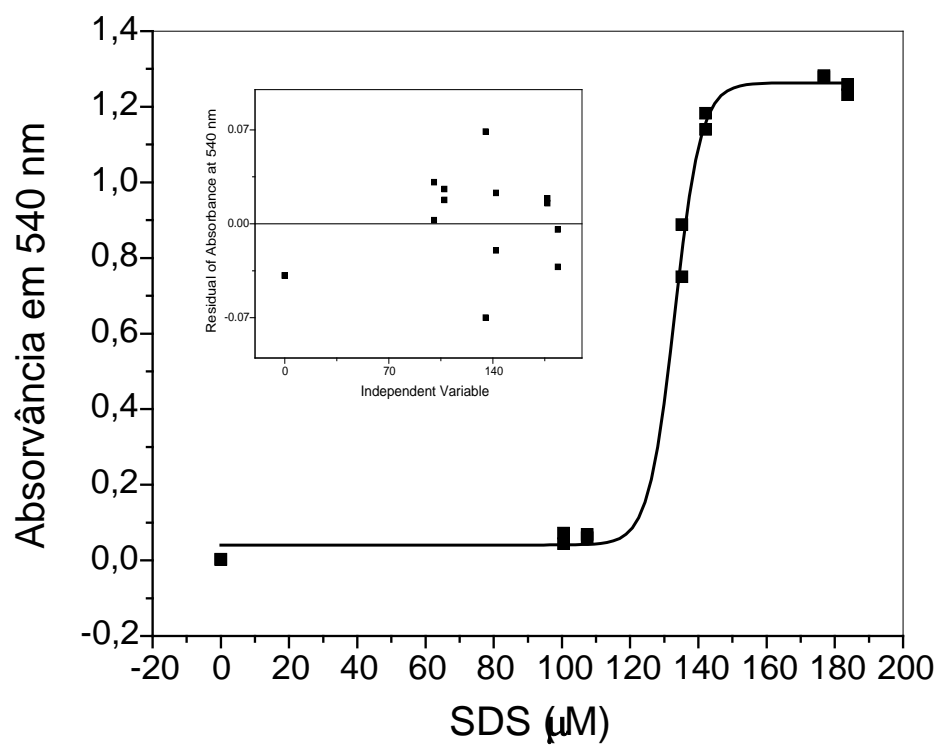


Figura 3.3: Curva de hemólise por SDS obtida com os dados interpolados a partir dos espectros de sangue total em diferentes concentrações de SDS. Condições: 0,9 g/dL de NaCl e 37 °C.

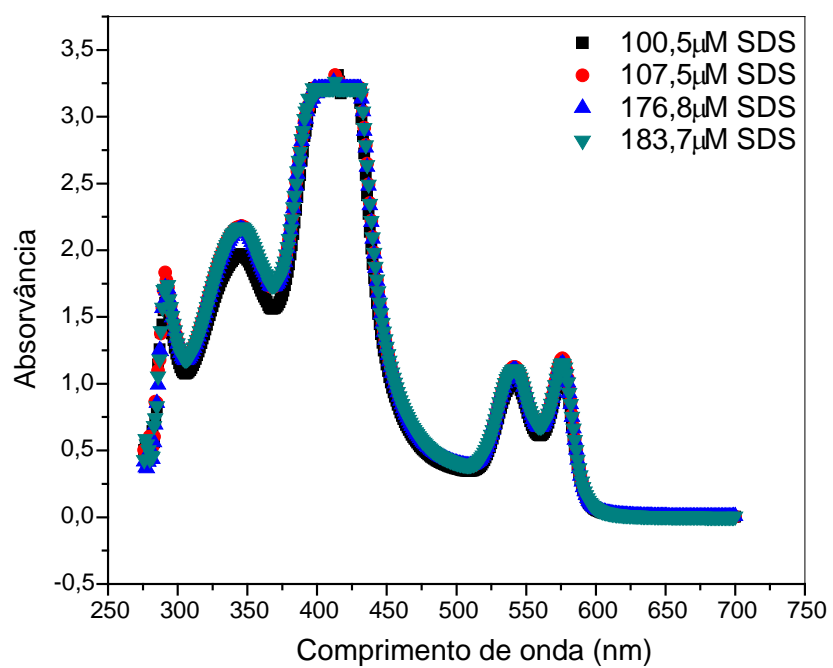


Figura 3.4: Espectros de hemoglobina humana em diferentes concentrações de SDS. Condições: 0,9 g/dL de NaCl e 37 °C.

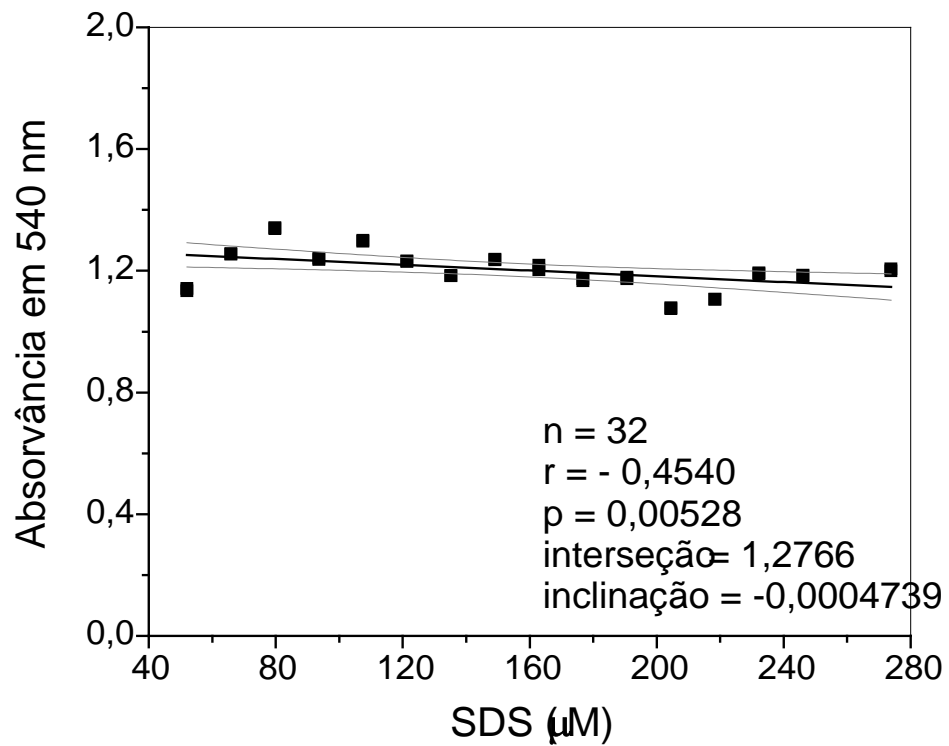


Figura 3.5: Dependência da absorvância a 540 nm da hemoglobina com a concentração de SDS. Condições: 0,9 g/dL de NaCl e 37 °C.

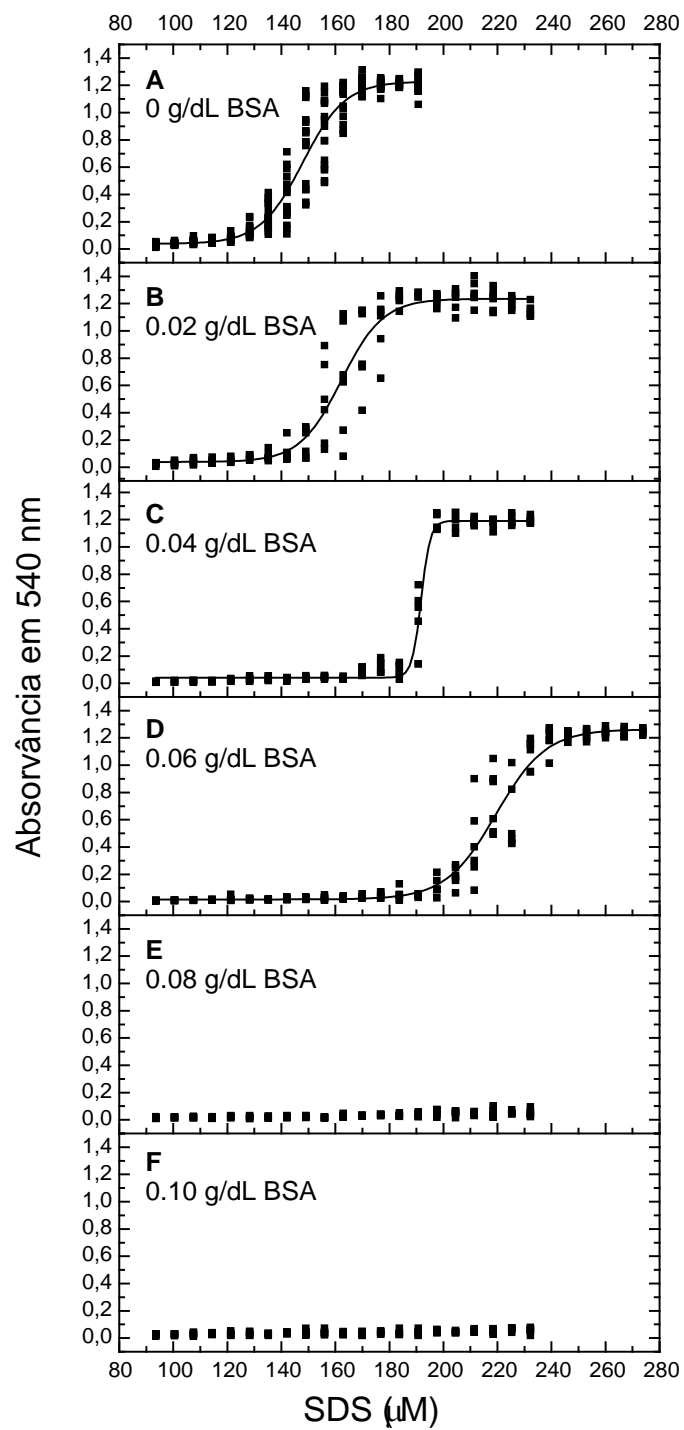


Figura 3.6: Influência da BSA sobre a hemólise por SDS. Condições: 0,9 g/dL de NaCl e 37 °C.

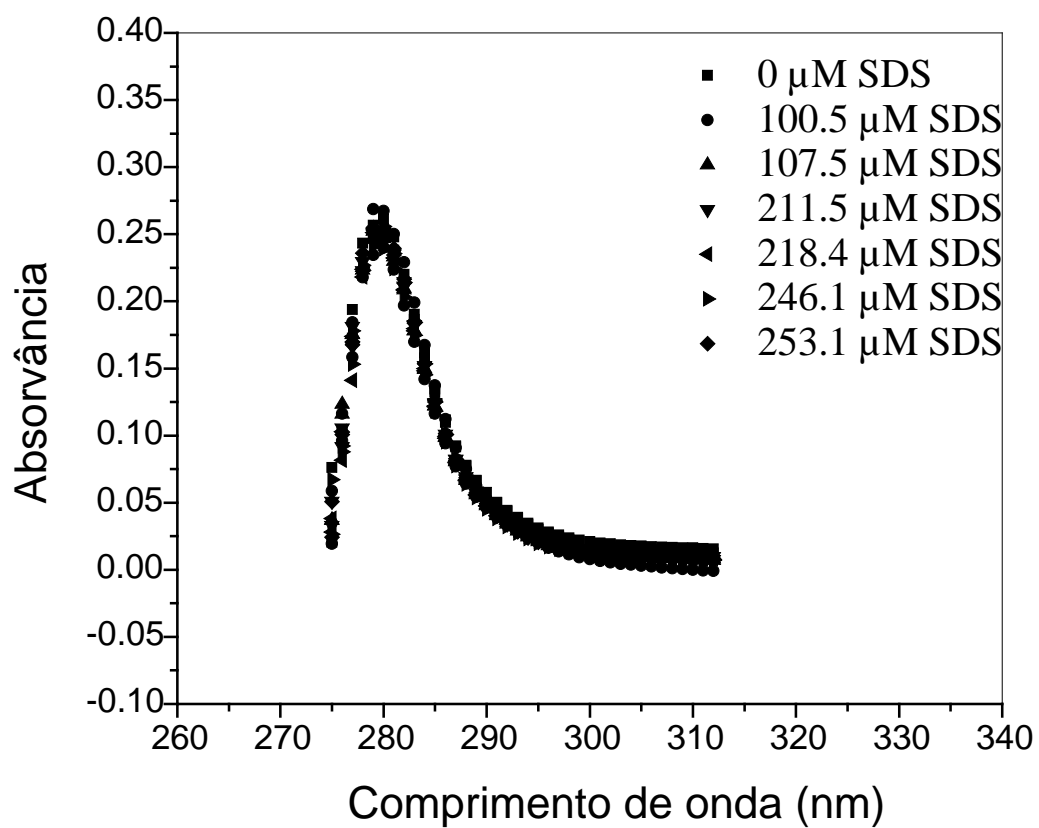


Figura 3.7: Influência da concentração de SDS sobre o espectro da BSA. Condições: 0,10 g/dL de BSA, 0,9 g/dL NaCl e 37 °C.

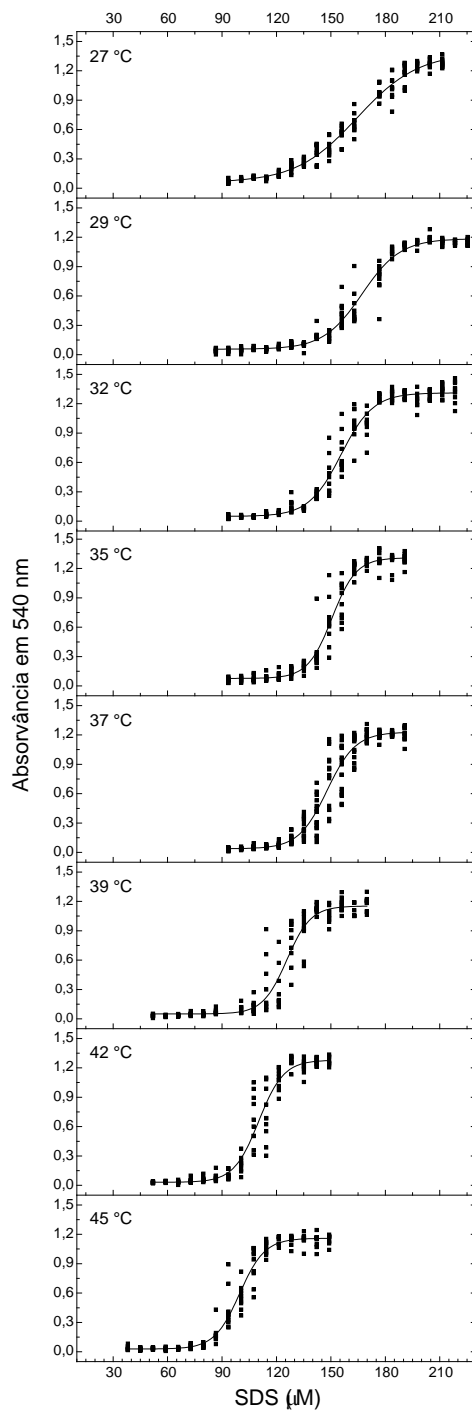


Figura 3.8: Influência da temperatura na hemólise induzida por SDS. Condição: 0,9 g/dL de NaCl.

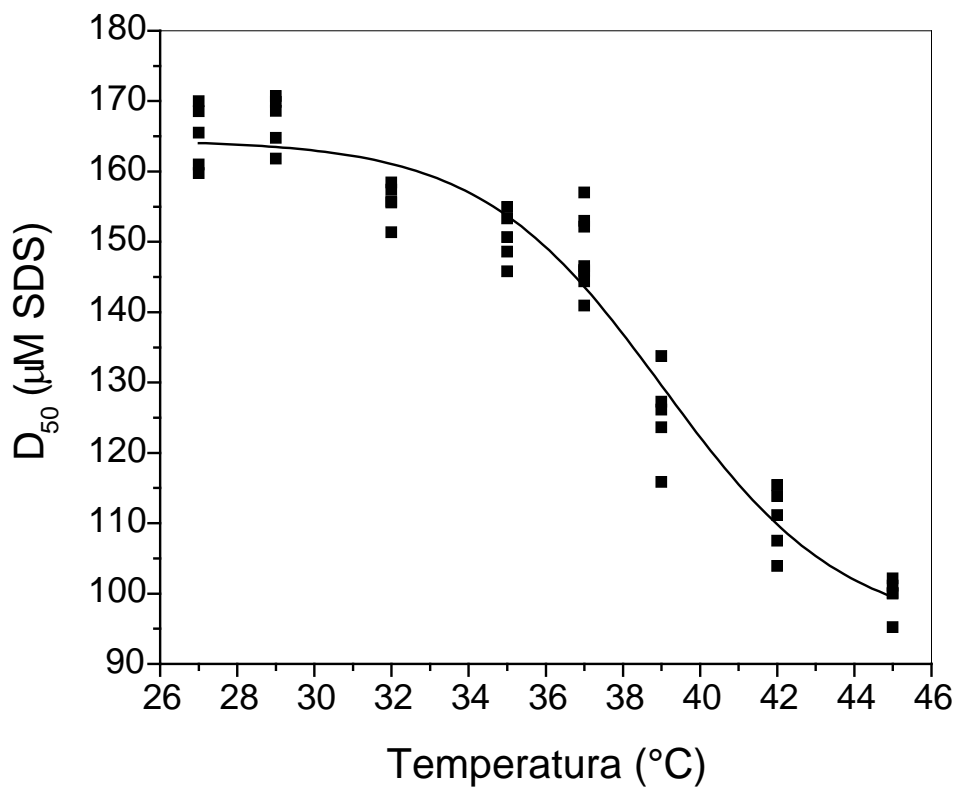


Figura 3.9: Dependência de D_{50} com a temperatura. Condição: 0,9 g/dL de NaCl.

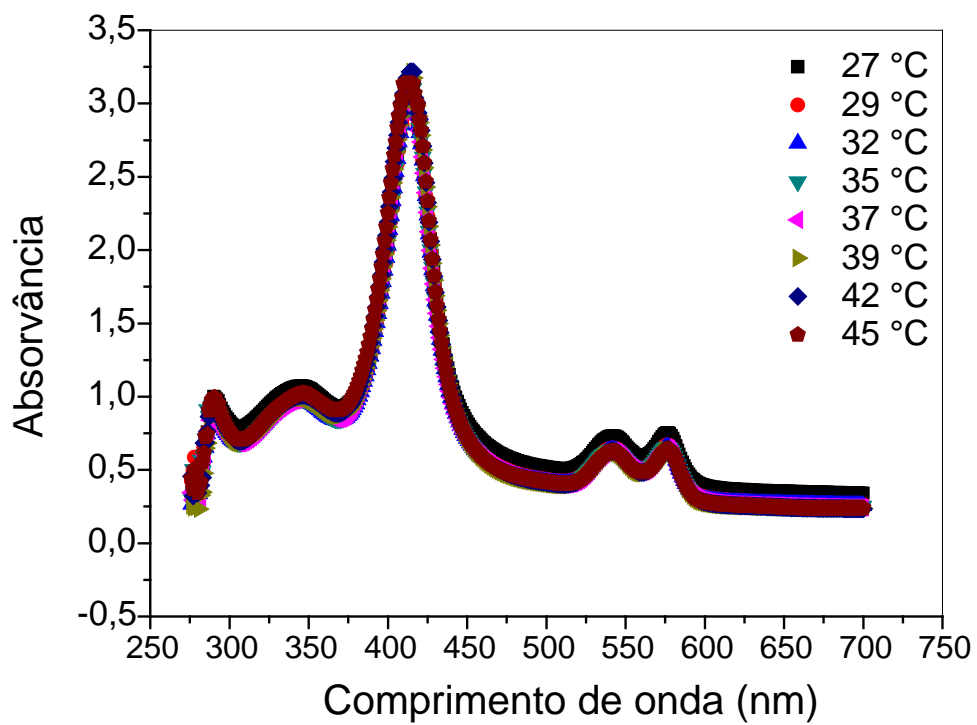


Figura 3.10: Influência da temperatura sobre o espectro da hemoglobina humana. Condição: 0,9 g/dL de NaCl.

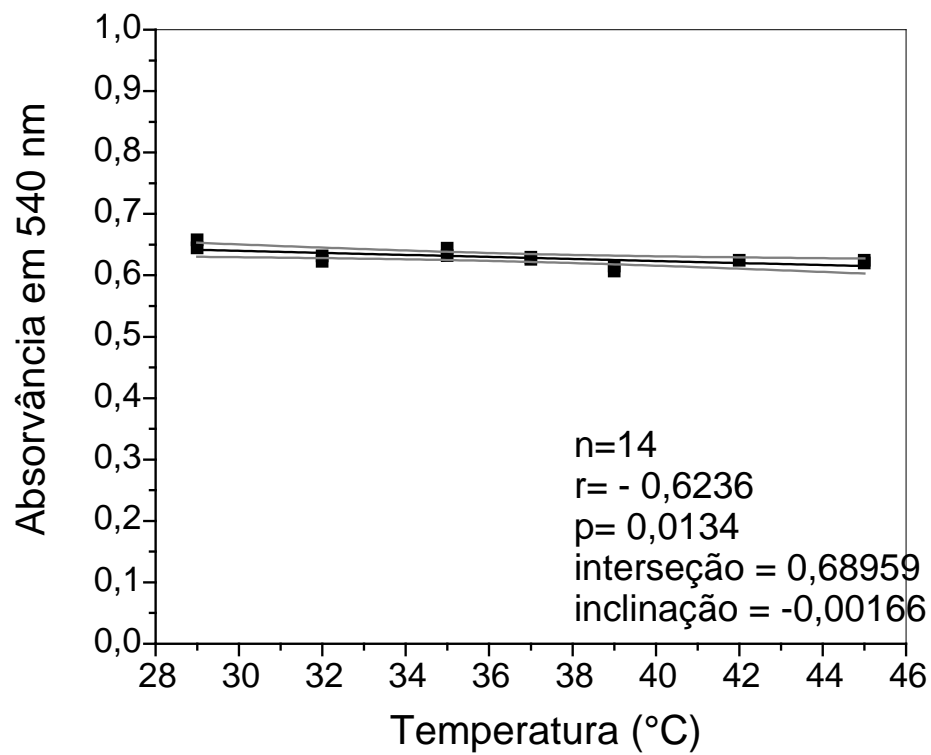


Figura 3.11: Dependência com a temperatura da absorvância a 540 nm da hemoglobina. Condição: 0,9 g/dL de NaCl.

Tabela 3.1: Valores de D_{50} e dD (média \pm sd) obtidos para a lise de eritrócitos humanos por SDS em 0.9 g/dL de NaCl e diferentes concentrações de BSA a 37 °C.

| BSA (g/dL) | D_{50} (μ M SDS) | dD (μ M SDS) |
|---------------|----------------------------|------------------------|
| 0 | 148 \pm 5,31 | 6,83 \pm 1,28 |
| 0.02 | 163 \pm 9,16 | 5,20 \pm 1,57 |
| 0.04 | 192 \pm 1,84 | 1,79 \pm 8,76 |
| 0.06 | 220 \pm 4,32 | 8,91 \pm 1,11 |

Table 3.2: Valores de D_{50} e dD (média \pm sd) obtidos para a lise de eritrócitos humanos por SDS em 0.9 g/dL de NaCl sob diferentes temperaturas.

| Temperatura (°C) | D_{50} (μ M SDS) | dD (μ M SDS) |
|---------------------|----------------------------|------------------------|
| 27 | 164,9 \pm 4,50 | 16,87 \pm 1,60 |
| 29 | 167,7 \pm 3,51 | 9,99 \pm 1,42 |
| 32 | 155,7 \pm 2,71 | 8,28 \pm 2,20 |
| 35 | 150,6 \pm 3,64 | 6,08 \pm 1,27 |
| 37 | 148,2 \pm 5,31 | 6,83 \pm 1,28 |
| 39 | 125,3 \pm 6,48 | 5,57 \pm 1,17 |
| 42 | 110,4 \pm 4,69 | 5,55 \pm 1,47 |
| 45 | 99,7 \pm 2,64 | 6,64 \pm 1,58 |

CONCLUSÕES

As concentrações de SDS necessárias para promover hemólise perturbaram apenas discretamente os espectros da hemoglobina e de BSA. A incorporação de BSA protegeu os eritrócitos humanos contra a lise induzida por SDS. A origem deste efeito foi atribuída à ligação de SDS pela BSA. O ponto de meia transição da curva de hemólise por SDS apresentou uma dependência sigmoideal decrescente com o aumento da temperatura entre 27 e 45 °C. Este efeito foi atribuído à existência de heterogeneidade na população de eritrócitos humanos.

REFERÊNCIAS

ABU-ZREIG, M.; RUDRA, R.P.; DICKNSON, W.T.; EVANS, L.J. Effect of surfactants on sorption of atrazine by soil. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 36, p. 249–263, 1999.

BHAIRI, S.M. Detergents - A guide to the properties and uses of detergents in biological systems. Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, 2001.

BIELAWISKY, J. Two types of haemolytic activity of detergents. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1035, p. 214-217, 1990.

CUNHA, C.C.; ARVELOS, L.R.; COSTA, J.O.; PENHA-SILVA, N. Effects of glycerol on the thermal dependence of the stability of human erythrocytes, **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 39, n. 4, p. 341-347, 2007.

DE FREITAS, M.V.; NETTO, R.C.M.; DA COSTA HUSS, J.C.; DE SOUZA, T.M.T.; COSTA, J.O.; FIRMINO, C.B.; PENHA-SILVA, N. Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. **Toxicology In Vitro**, v. 22, n. 1, p. 219-224, 2008.

DE FREITAS, M.V.; OLIVEIRA, M.R.; SANTOS, D.F., NETTO, R.C.M.; FENELON, S.B.; PENHA-SILVA, N. Influence of the use of statin on the stability of erythrocyte membranes in multiple sclerosis. **Journal of Membrane Biology**, doi: 10.1007/s00232-010-9232-y (In press), 2010.

DE JONG, A.; PLAT, J.; MENSINK, R.P. Plant sterol or stanol consumption does not affect erythrocyte osmotic fragility in patients on statin treatment. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 60, p. 985-990, 2006.

DUCHNOWICZ, P.; KOTER, M. Damage to the erythrocyte membrane caused by chlorophenoxyacetic herbicides. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v. 8, p. 25-31, 2003.

FONSECA, L.C.; CORRÊA, N.C.R.; GARROTE-FILHO, M.S.; CUNHA, C.C.; PENHA-SILVA, N. Effects of the solvent composition on the stability of proteins in aqueous solutions. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 543-548, 2006.

GILCA, M.; LIXANDRU, D.; GAMAN, L.; VIRGOLICI, B.; STOIAN, I.; ATANASIU, V. Erythrocyte membrane stability and antioxidant status in patients with Alzheimer's disease. **Haematologica-The Hematology Journal**, v. 93, p. 565-565, 2008.

HELENIUS, A.; SIMONS, K. Solubilization of membranes by detergents. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 415, p. 29-79, 1975.

JAY, A.W.L.; ROWLANDS, S. Stages of osmotic hemolysis. **The Journal of Physiology**, v. 252, n. 817-832, 1975.

KANDAGAL, P.B.; ASHOKA, S.; SEETHARAMAPPA, J.; SHAIKH, S.M.T.; JADEGOUD, Y.; IJARE, O.B. Study of the interaction of an anticancer drug with human and bovine serum albumin: spectroscopic approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 393-399, 2006.

KARABULUT, I.; BALKANCI, Z.D.; PEHLIVANOGLU, B.; ERDEM, A.; FADILLIOGLU, E. Effect of toluene on erythrocyte membrane stability under in vivo and in vitro conditions with assessment of oxidant/antioxidant status. **Toxicology and Industrial Health**, v. 25, p. 545-550, 2009.

KLESZCZYNSKA, H.; BONARSKA, D.; BIELECKI, K.; SARAPUK, J. The hemolytic and physiologic activities of mixtures of some phenoxy and organophosphorous herbicides. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v. 8, p. 55-61, 2003.

KRAGH-HANSEN, U.; HELLEC, F.; DE FORESTA, B.; LE MAIRE; MØLLER, J.V. Detergents as probes of hydrophobic binding cavities in serum albumin and other water-soluble proteins. **Biophysical Journal**, v. 80, n. 6, p. 2898-2911, 2001.

LEE, I.-J.; LIM, H.-S.; PARK, D.-G; KIM, K. Effects of SDS and temperature on the structural changes of Bacteriorhodopsin. **Bulletin of Korean Chemistry Society**, v. 10, n. 1, p. 69-71, 1989.

LI, J.; LIU, X.; REN, C.; LI, J.; SHENG, F.; HU, Z. In vitro study on the interaction between thiophanate methyl and human serum albumin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B Biology**, v. 94, p. 158-163, 2009.

LIU, W.; GUO, X.; GUO, R. The interaction between hemoglobin and two surfactants with different charges. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, p. 548–557, 2007.

MITJANS, M.; INFANTE, M.R.; VINARDELL, M.P. Human hemoglobin denaturation as an alternative to the draize test for predicting eye irritancy of surfactants. **Regulatory, Toxicology and Pharmacology**, v. 52, p. 89-93, 2008.

MOOSAVI-MOVAHEDI, A.A. Thermodynamics of protein denaturation by sodium dodecyl sulfate, **Journal of the Iranian Chemical Society**. v. 2, n. 3, p. 189-196, 2005.

MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K. Membranas: estrutura, montagem e função. In: Granner, D.K.; Mayes, P.A.; Rodwell, V.W. **Haper's Biochemistry**. 9ª ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2002.

NARENDRA, M.; BHATRACHARYULU, N.C.; PADMAVATHI, P.; VARADACHARYULU, N.C. Prallethrin induced biochemical changes in erythrocyte membrane and red cell osmotic haemolysis in human volunteers. **Chemosphere**, v. 67, n. 6, p. 1065-1071, 2007.

NEUGEBAUER, J. A guide to the properties and uses of detergents in biology and biochemistry. Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, 1994.

PARSI, K.; EXNER, T.; CONNOR, D.E.; HERBERT, A.; MAAB, D.D.F.; JOSEPH, J.E. The lytic effects of detergent Sclerosants on erythrocytes, platelets, endothelial cells and microparticles are attenuated by albumin and other plasma components in vitro. **European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery**, v. 36, p. 216-223, 2008.

PENHA-SILVA, N.; ARVELOS, L.R.; CUNHA, C.C.; AVERSI-FERREIRA, T.A.; GOUVÊA-E-SILVA, L.F.; GARROTE-FILHO, M.S.; FINOTTI, C.J.; BERNADINHO-NETO, M.; DE FREITAS REIS, F.G. Effects of glycerol and sorbitol on the thermal dependence of the lysis of human erythrocytes by ethanol. **Bioelectrochemistry**, v. 73, n. 1, p. 23-29, 2008.

PENHA-SILVA, N.; FIRMINO, C.B.; DE FREITAS REIS, F.G.; DA COSTA HUSS, J.C.; DE SOUZA, T.M.T.; DE FREITAS, M.V.; NETTO, R.C.M. Influence of age on the stability of human erythrocyte membranes. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 128, n. 7-8, p. 444-449, 2007.

RABINI, R.A.; POLENTA, M.; STAFFOLANI, R.; TOCCINI, M.; SIGNORI, R.; TESTA, I.; MAZZANTI, L. Effect of hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitors on the functional properties of erythrocytes membranes. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 59, p. 51-57, 1993.

RODI, P.M.; TRUCCO, V.M.; GENNARO, A.M. Factors determining detergent resistance of erythrocyte membranes. **Biophysical Chemistry**, v. 135, p. 14-18, 2008.

SÁNCHEZ, L.; MARTÍNEZ, V.; INFANTE, M.R.; MITJANS, M.; VINARDELL, M.P. Hemolysis and antihemolysis induced by amino acid-based surfactants. **Toxicology Letters**, v. 169, p. 177-184, 2007.

SANCHEZ-CAMAZANO, M.; SANCHEZ-MARTIN, M.J.; RODRIGUEZ-CRUZ, M.S. Sodium dodecyl sulphate-enhanced desorption of atrazine: effect of surfactant concentration and of organic matter content of soils. **Chemosphere**, v. 41, p. 1301-1305, 2000.

SHALEL, S.; STREICHMAN, S.; MARMUR, A. The mechanism of hemolysis by surfactants: effect of solution composition. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 252, p. 66–76, 2002a.

SHALEL, S.; STREICHMAN, S.; MARMUR, A. Monitoring surfactant-induced hemolysis by surface tension measurement. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 255, p. 265–269, 2002b.

TANFORD, C. Protein denaturation. **Advances in Proteins Chemistry**, v. 23, p. 121-282, 1968.

TSONG, T.Y.; KINGLSEY, E. Hemolysis of human erythrocyte induced by a rapid temperature jump. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 2, p. 786-789, 1975.

VIVES, M.A.; INFANTE, M.R.; GARCIA, E.; SELVE, C.; MAUGRAUS, M.; VINARDELL, M.P. Erythrocyte hemolysis and shape changes induced by new lysine-derivate surfactants. **Chemico-Biological Interactions**, v. 118, p. 1-18, 1999.

ZUNSZAIN, P.A.; GHUMAN, J.; KOMATSU, T.; TSUCHIDA, E. Crystal structural analysis of human serum albumin complexed with hemin and fatty acid. **BMC Structural Biology**, v. 3, n. 6, p. 1-9, 2003.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)