UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Pós-Graduação em Farmácia

Área de Análises Clínicas

PERMEABILIDADE DE MEMBRANAS AO ÂNION
RADICAL SUPERÓXIDO (O_2^-)

ESTABELECIMENTO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA
 O_2^- E ESTUDO PRELIMINAR DE PERMEABILIDADE EM
VESÍCULAS DE ANFIFÍLICO SINTÉTICO

LÍGIA FERREIRA GOMES

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. DOMÊNICO H. G. P. BARBIERI

11833

São Paulo
1989

Dedicatória

Ao Luiz, com amor

Agradecimentos

A Deus que " ...deu aos homens a ciência para ser por eles honrado em suas maravilhas..." Ecl. 38,6.

A meus pais, pelo exemplo de responsabilidade e amor com que desempenham sua função de educadores e pelo apoio e amizade sempre presentes em minha vida.

Ao Prof. Dr. Domênico H.G.P. Barbieri, pela liberdade e pela confiança com que me honrou na orientação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Mario J. Politi, pelas discussões didáticas sobre os ensaios fotoquímicos e pelo auxílio no laboratório que possibilitaram a realização deste trabalho,

A Profa. Dra. Iolanda Midea Cuccovia, pela amizade, pelo auxílio nos ensaios com vesículas, por desenhar as figuras e pelo exemplo de clareza e simplicidade.

Ao Prof. Dr. Pedro Soares de Araújo, pelas explicações instrutivas e bem-humoradas sobre a obtenção de vesículas unilamelares grandes.

Ao Prof. Dr. Hernan Chaimovich, pela oportunidade de desenvolver este trabalho em seu laboratório e pela atenção dispensada a cada etapa de sua realização.

A Luiz Carlos Donizetti Gonçalves, por compartilhar com amor todos os momentos e pelo auxílio com a programação do computador.

Ao Prof. Dr. Eduardo Lissi, pela deferência concedida de ler e criticar este trabalho e pelas sugestões.

Ao Prof. Dr. Roberto Forneris pelo espírito universitário, colocando à disposição equipamento óptico de seu laboratório.

Aos colegas,

Prof. Antonio Altair M. Oliveira

Profa. Lúcia Helena Meloni Bruneri

Profa. Primavera Borelli Garcia

e aos funcionários da Disciplina de Hematologia
Clínica, pela amizade, pelo incentivo, pela
compreensão e pelo auxílio com as tarefas
cotidianas do Laboratório Clínico.

A Moema e aos funcionários da Biblioteca do Conjunto das Químicas, pela disponibilidade em dirimir dúvidas e pela organização das referências bibliográficas.

A Edjane, pelo precioso auxílio técnico.

A Neusa e à Benedita, pela manutenção da infraestrutura do laboratório, indispensáveis à realização deste trabalho.

A Sofia, pela eficiência na secretaria e amizade com que muitas vezes economizou meu tempo.

Aos colegas de pós-graduação, por compartilharem as alegrias e decepções e pelo incentivo cotidiano.

As Profas. Dras. Virginia B.C. Junqueira, Dulcinéia S. P. Abdalla, Sílvia B.M. Barros e Kioko Takei, pelo carinho e pelos conselhos úteis.

A Celina, Ariane, Cléa e Ana Lúcia, pela amizade, pelo apoio e pela alegria compartilhada a cada conquista.

A Aparecida da Silva, pela dedicação com que cuidou da minha casa enquanto eu realizava este trabalho.

ÍNDICE

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	ii
ÍNDICE.....	v
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1 Materiais.....	20
3.1.1. Corantes e reagentes.....	20
3.1.2. Lipídios e detergentes.....	20
3.1.3. Solventes.....	21
3.1.4. Soluções tampão.....	22
3.1.5. Gel para cromatografia.....	22
3.1.6. Aparelhagem.....	22
3.2. Métodos.....	23
3.2.1. Obtenção das vesículas.....	23
3.2.1.1. Preparação de vesículas por evaporação de fase reversa.....	24
3.2.1.2. Preparação de vesículas por injeção..	25
3.2.2. Ensaio de fotólise.....	26
3.2.3. Verificação da permeabilidade de LUVs ao O_2^-	28
4. RESULTADOS.....	30
4.1. Sistema gerador de O_2^-	30
4.2. Efeito de interfaces sobre a geração de O_2^-	33
4.3. Sistema detetor de O_2^-	35

4.4. Efeitos de interfaces sobre a detecção de O_2^-	38
- Efeitos sobre as características espectrais dos componentes do sistema detetor.....	38
- Efeitos sobre a estabilidade dos componentes do sistema detetor.....	41
4.5. Ajuste dos dados cinéticos.....	43
4.6. Curvas padrão de O_2^-	44
4.7. Efeitos de interface sobre a velocidade da reação NBT/ O_2^-	44
4.8. Permeabilidade de vesículas unilamelares grandes de HERQUAT ao O_2^-	46
5. DISCUSSÃO.....	51
5.1. Método analítico para O_2^-	51
5.2 Efeito de interfaces.....	60
5.3 Permeabilidade de bicamadas ao O_2^-	65
6. CONCLUSÕES.....	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

1. INTRODUÇÃO

A toxicidade do oxigênio pode ser considerada como o preço pago pelos organismos por uma aquisição evolutiva importante: a aerobiose⁵⁵. Em eucariotos, o oxigênio utilizado pelas células na respiração é reduzido a água, na mitocôndria, pela citocromo oxidase. Uma pequena fração ($\approx 5\%$) do oxigênio consumido, entretanto, é reduzida em um processo univalente, por outros sistemas, conforme a reação abaixo 8.13.25:

$O_2^{\cdot-}$: ânion radical superóxido, $OH^{\cdot}$: radical hidroxila

A importância da redução univalente do oxigênio relaciona-se à reatividade das espécies intermediárias produzidas^{25,74}. Diversas vias metabólicas têm, como subprodutos, espécies reativas do oxigênio (ERO)⁸: cadeias de transporte de elétrons na mitocôndria, no retículo endoplasmático e nas membranas nucleares; enzimas relacionadas com o metabolismo do ácido araquidônico; citocromo p-450; etc. Em muitos casos estes intermediários têm função metabólica, por exemplo na síntese de hormônios da tireoide e de prostaglandinas, na oxidação microsomal de etanol,

na geração de mediadores vasoativos e como efetores da defesa celular durante a fagocitose^{7.13.25.31.71}.

Atribuem-se efeitos tóxicos agudos às espécies reativas de oxigênio, as quais também têm sido implicadas no mecanismo fisiopatológico de uma série de condições crônicas como câncer, doenças cardiovasculares e envelhecimento³⁴. Uma série de evidências indiretas sugere a participação do ânion radical superóxido (O_2^-) como intermediário de reações intracelulares envolvidas na gênese de estados patológicos^{33.57}. Uma das questões não respondidas com relação à verdadeira participação do O_2^- como agente de lesão diz respeito à sua capacidade de difundir "in vivo" e de permear membranas. A partir de estudos sobre as reações do O_2^- "in vitro", foram sugeridos mecanismos para a sua ação tóxica "in vivo", como a peroxidação de lipídios de membrana, a oxidação de proteínas e a lesão a ácidos nucleicos^{10.13.34.54.56}. Algumas das reações do O_2^- poderiam responder por dano celular, porém não se constituiriam nos principais mecanismos operantes em sistemas biológicos^{13.34}.

O O_2^- reage como um nucleófilo forte em meio não aquoso: no interior de membranas pode destruir fosfolípidos por ataque aos grupos carbonílicos das

ligações éster que ligam os ácidos graxos ao glicerol⁷⁴.

Em solução aquosa, o O_2^- é um agente redutor⁷⁵. A dismutação espontânea do O_2^- - uma das vias importantes no seu decaimento - resulta na formação de H_2O_2 e de O_2 , descrita pelas seguintes reações:

$$k_{IIa} = 7,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}, \quad k_{IIb} = 8,5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1},$$

$$k_{IIc} < 100 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$$

A formação de H_2O_2 é um dos fatores responsáveis pela toxicidade do O_2^- . Apesar de serem conhecidos efeitos diretos do H_2O_2 sobre células e tecidos^{34,55,56,65}, o OH^- formado pela reação do O_2^- com o H_2O_2 é frequentemente apontado como a espécie causadora de lesões primárias responsáveis pelo dano celular. A velocidade de reação do OH^- com substratos biológicos têm controle difusional. O OH^- reage muito rapidamente no local em que é gerado e sem selecionar o alvo, exceto pela proximidade. Embora muitas das reações do OH^- possam ser iniciadoras de reações em cadeia, o desencadeamento de lesões à distância por esta espécie - que tem uma curta meia vida em solução -

depende da difusibilidade de suas espécies geradoras, O_2^- e H_2O_2 .

A reação entre O_2^- e H_2O_2 (Reação de Haber-Weiss)³³,

é lenta em solução aquosa e, certamente, não ocorreria nas concentrações de O_2^- e de H_2O_2 usualmente presentes "in vivo". A catálise da reação (III) por ions metálicos e seus complexos pode, no entanto, transformá-la numa via importante de decaimento do O_2^- e resultar em considerável produção de OH^- , mesmo quando apenas traços das espécies catalisadoras estão presentes no meio de reação. A Reação de Haber-Weiss atua então como a soma de duas reações, uma delas conhecida como Reação de Fenton (IVa) :

A constante de velocidade da reação catalisada por Fe^{2+} é de $k_{Fe} = 76 M^{-1} s^{-1}$ e a da reação catalisada por Cu^{1+} , $k_{Cu} = 10^9 M^{-1} s^{-1}$. A reação de O_2^- com alguns complexos de cobre e ferro também é importante geradora de formas reduzidas capazes de participar deste mecanismo³⁵. A reação:

por exemplo, possui uma constante de velocidade de $k_v = 1,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ²⁴. "In vivo", a disponibilidade de íons e de complexos metálicos eficientes como catalisadores da Reação de Fenton pode fornecer OH^- . Por outro lado, a formação de complexos metálicos não eficientes como reagentes de Fenton pode ser um modo de diminuir o risco de ocorrência de lesão por OH^- ²⁵.

Desde a descrição da função catalítica da superóxido dismutase (SOD)²⁶ sobre o desproporcionamento do O_2^- , têm sido feitas tentativas de identificar processos em que a SOD represente uma "proteção" para as células^{13.15.41.48.52.70}. Esta função protetora é postulada devido à capacidade da SOD de manter concentrações de O_2^- intracelular da ordem de picomolar^{34.51.52.53}. Sistemas de diferentes graus de complexidade como procariotos, células de eucariotos, tecidos isolados e até organismos superiores considerados como um todo, apresentam correlação positiva entre a presença desta enzima e a proteção contra danos oxidativos⁵³. A abordagem mais comum nesses estudos é a detecção de O_2^- pelo uso combinado de reagentes cromogênicos e SOD, como por exemplo no processo de autooxidação de hemoglobinas⁷⁰. O envolvimento do O_2^- em algumas

anemias hemolíticas^{15.37.46} reúne capítulos importantes da bioquímica do oxigênio e tem sido objeto de intensa investigação nas últimas décadas ^{13.15.34.37.41.48.70}. Atribui-se à peroxidação de lipídios e à oxidação de proteínas a mediação, a nível molecular, de eventos hemolíticos que envolvem oxidação de hemoglobina e o aparecimento de várias condições nas quais a vida média do eritrócito está diminuída^{15.41.66.75.77}. Outras evidências nesse sentido foram obtidas à partir da identificação dos mecanismos de proteção do eritrócito contra lesões oxidativas. Deficiências das "defesas biológicas contra dano oxidativo", espontâneas ou induzidas experimentalmente, associam-se à lise eritrocitária^{15.41.77.84}. Estas defesas são representadas principalmente por SOD, catalase e glutathione peroxidase e por redutores como alfa tocoferol e ácido ascórbico. A extensão do dano produzido pela ação combinada de O_2^- e H_2O_2 , considerando-se a lesão oxidativa a membranas, correlaciona-se com a concentração local de substâncias antioxidantes e com o grau de insaturação dos lipídios¹⁵.

Espécies reativas de oxigênio são iniciadores de peroxidação lipídica não catalisada por enzimas, um tipo de dano oxidativo que afeta primariamente ácidos graxos insaturados e poliinsaturados,

modificando como consequência - e segundo um mecanismo complexo - a estrutura e a função de membranas³⁴. O processo envolve uma série de reações em cadeia iniciadas pela abstração de um átomo de hidrogênio de um carbono vicinal a uma insaturação. Propaga-se pela adição de uma molécula de oxigênio ao radical de carbono com a formação de radicais peroxila e pela formação de radicais alcoxila, em reações catalizadas por metais e complexos metálicos³⁴. Por cisão das moléculas de ácido graxo oxidado formam-se moléculas menores como aldeídos e hidrocarbonetos, cujos radicais também podem ser propagadores do processo peroxidativo. Outras espécies químicas, como endoperóxidos cíclicos, também são formadas³⁴. Este conjunto de alterações na composição de membranas seria responsável por profundas alterações em suas propriedades como fluidez e permeabilidade. No entanto, a peroxidação afeta também a porção protéica das membranas, porque os aldeídos e os radicais formados reagem com grupos amino e sulfidríla resultando em oxidação e agregação de proteínas e, portanto, em perda de função de receptores e enzimas de membrana, rompimento de organelas e morte celular³⁴.

A geração de O_2^- associada à formação de metahemoglobina levou à proposição de que o O_2^-

fosse um produto de oxidação da oxihemoglobina e, consequentemente, a sugerir que a SOD eritrocitária tivesse um papel protetor, limitando o dano por diminuir a concentração dessa espécie reativa²⁹. Em condições fisiológicas o oxigênio ligado à hemoglobina pode ser reduzido por dois mecanismos distintos. Um deles, a dissociação de O_2^- e metahemoglobina, é uma reação lenta que pode responder pela produção diária normal de metahemoglobina. Um segundo processo, mais rápido, envolve a transferência simultânea de dois elétrons para o oxigênio resultando na produção de H_2O_2 ³⁰. Um dos elétrons provem do átomo de ferro da hemoglobina e o outro de um doador externo. Várias drogas ditas oxidantes formam quantidades variáveis de intermediários da redução do oxigênio por este segundo mecanismo, provocando hemólise^{15,48,50}. O grau da hemólise, tanto "in vitro", quanto "in vivo", é significativamente maior em eritrócitos deficientes em glicose-6-fosfato-desidrogenase^{15,37}. Logo, para a manutenção da integridade celular e da função da hemoglobina, é importante a formação de redutores (NADH e NADPH). A hemólise provocada "in vitro" pela geração enzimática de O_2^- e de H_2O_2 é impedida pela ação da SOD e da catalase⁴¹. A metemoglobina é reduzida a desoxihemoglobina pela flavoproteína metemoglobina

redutase, uma NADH-citocromo b_5 -redutase solúvel⁷⁷. Existe uma outra metemoglobina redutase nos eritrócitos que utiliza NADPH; porém esta enzima depende da presença de um corante como o azul de metileno para atuar e seu papel fisiológico permanece obscuro⁷⁷. O NADPH é utilizado pela glutathiona-redutase, uma flavoproteína dependente de NADPH, a qual reduz dissulfetos de glutathiona mantendo uma concentração intracelular adequada de glutathiona reduzida⁷⁷. A glutathiona também é considerada uma proteção antioxidante. Além de reagir diretamente com o $O_2^{\cdot -}$, este peptídio pode ser um substrato da glutathiona peroxidase que reduz peróxidos tais como o H_2O_2 (produzido durante a formação de metemoglobina) ou peróxidos de lipídios (formados durante a lesão oxidativa a membranas).

As espécies reativas de oxigênio também é creditada a modulação, ou até a mediação, de fenômenos componentes do processo inflamatório, como fagocitose, vasodilatação e aumento da permeabilidade⁷¹⁻⁷³. Macrófagos e neutrófilos ativados produzem espécies reativas de oxigênio durante a fagocitose. Foi sugerido que o $O_2^{\cdot -}$ gerado por células endoteliais ou neutrófilos ativados seja uma resposta inicial ao estímulo inflamatório, aumentando a adesividade de monócitos, macrófagos e dos próprios neutrófilos à superfície

endotelial¹¹⁻⁴⁷. A geração, no espaço extracelular, de grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio e de outras substâncias como o hipoclorito, pela ação da enzima mieloperoxidase dos neutrófilos, seria subsequente a esta resposta e amplificada por ela⁷¹⁻⁷³.

"In vitro", neutrófilos ativados causam hemólise passível de inibição por captadores de radicais livres e mediada por peroxidação de lipídios da membrana¹⁴.

A disponibilidade de O_2^- pode ser um critério decisivo no estabelecimento de dano celular por OH^- formado segundo a Reação de Haber-Weiss. A localização celular da SOD pode ser o fator determinante da proteção à lesão oxidativa. Estudos realizados com hepatócitos mostraram que apenas a SOD intracelular protege da toxicidade de H_2O_2 ⁴⁴. A capacidade do O_2^- de difundir em sistemas biológicos e de permear membranas é, portanto, um aspecto importante na compreensão de suas reações "in vivo", uma vez que a sua produção é compartimentalizada e que a principal enzima atuante na sua remoção é principalmente intracelular³⁴⁻³²⁻⁵³. Como o H_2O_2 é capaz de permear membranas²⁴, a toxicidade devida à formação de radicais hidroxila em sítios determinados poderia ser controlada pela

permeabilidade ao O_2^- . É nesta área geral que se situa o interesse deste trabalho.

Existem indícios de que o O_2^- seja capaz de permear bicamadas lipídicas a temperaturas acima daquela da transição de fase^{30,31,72}. A complexidade das membranas biológicas é, entretanto, um dos fatores que dificultam a identificação e caracterização da permeabilidade a ions, em particular ao O_2^- ²⁸. Note-se também que a ação do O_2^- sobre os componentes de membranas altera a permeabilidade das mesmas^{30,40}.

Uma abordagem possível é a comparação com modelos adequados. Embora não possamos contar com modelos perfeitos, alguns deles são suficientemente conhecidos para serem utilizados na investigação de algumas propriedades de membranas biológicas^{23,37}.

A estratégia experimental de utilização de SOD fornece dados controversos em experimentos que objetivam verificar permeação. A proteção oferecida por SOD à ação do O_2^- sobre um substrato varia com o sistema utilizado. Experimentos realizados com tilacóides de cloroplastos e com liposomos mostraram que somente a SOD localizada no mesmo compartimento em que o O_2^- era produzido protegia o substrato da ação do O_2^- ²⁴. Com membranas isoladas de eritrócitos, entretanto, dependendo da natureza da reação utilizada para produzir o O_2^- , a SOD

localizada em outro compartimento oferece proteção mais eficiente⁴⁶⁻⁴⁷. A este respeito, foi proposto que a geração de O_2^- em sítios localizados na interface da membrana facilitaria sua exportação através da bicamada. O acesso da SOD ao O_2^- gerado próximo à interface seria menor devido à repulsão eletrostática entre a enzima e a membrana no pH fisiológico⁴⁷. Ensaio realizado para verificar a permeação da membrana celular por O_2^- através de canais de ânions não conduziram a resultados conclusivos²⁸⁻⁴⁷. "In vivo" os eritrócitos poderiam agir na proteção às espécies reativas de oxigênio, removendo do meio o O_2^- por ação da SOD contida no seu interior.

A utilização de membranas isoladas de eritrócitos não é livre de inconvenientes: após a reconstituição permanecem "poros" com, no mínimo, 0,7µm de diâmetro. Este diâmetro é suficiente para permitir a permeação do O_2^- e pode ser bem maior, dependendo da metodologia de reconstituição da membranas⁴⁶⁻⁴⁷.

Vários outros sistemas são empregados para mimetizar fenômenos biológicos, destacando-se aqueles formados por agregados de substâncias anfifílicas²²⁻²³. Estes compostos, por possuírem uma parte polar, hidrofílica, e uma parte apolar, hidrofóbica, agregam-se em meio aquoso minimizando

o contato entre a água e a parte apolar. Resultam desta agregação estruturas supramoleculares, isto é, arranjos de moléculas. A agregação depende da solubilidade, da estrutura e da concentração do detergente e também das características do meio, como por exemplo concentração salina, temperatura, presença de aditivos, etc... Entre estas estruturas supramoleculares, monocamadas, micelas e bicamadas têm sido usadas como modelos de interfaces biológicas^{22,23}. Monocamadas são filmes monomoleculares formados em interfaces entre água e ar ou água e óleo, constituídas por camadas contínuas de substâncias anfifílicas²³.

Micelas são estruturas dinâmicas; formam-se espontaneamente em soluções de detergente com concentrações maiores que a mínima necessária para que ocorra a micelização (CMC). Quando a concentração de detergente é elevada muito acima da CMC, as micelas podem passar de uma forma esférica para formas mais alongadas, até formarem estruturas cilíndricas e lamelares. Em concentrações muito altas, detergentes formam cristais líquidos. Muitas das aplicações de micelas devem-se à sua capacidade de solubilizar substâncias insolúveis em água e concentrá-las. São largamente empregadas como modelos de catálise enzimática^{22,23}.

Bicamadas são estruturas supramoleculares formadas tipicamente por fosfolípidios em meio aquoso. Podem ser preparadas de diversas maneiras e compreendem diversas formas. Aplicam-se a estudos de permeabilidade e transporte, mimetizando a porção lipídica das membranas naturais. A hidratação de um filme de fosfolípido depositado nas paredes de um tubo de ensaio, seguida de agitação, origina bicamadas em suspensão, na forma de vesículas multilamelares. Outra maneira de obter bicamadas consiste em pincelar uma suspensão de lípidios em um orifício interposto entre dois compartimentos aquosos²³. Vesículas unilamelares pequenas (SUV) com diâmetros de 200 a 500 Å, são obtidas por sonicação da suspensão do lípidio. Vesículas unilamelares com diâmetros de 0.1 a 10 µm podem ser preparadas por outros métodos, por exemplo a injeção controlada do lípidio dissolvido em éter, em etanol ou em clorofórmio sobre o meio aquoso, em condições que assegurem a remoção simultânea do solvente utilizado²⁴.

Muitas das propriedades de membranas naturais devem-se às características da sua parte lipídica, as quais são modificadas e moduladas por interações entre lípidios e proteínas. A permeabilidade de bicamadas lipídicas a íons foi bastante estudada utilizando-se vesículas como modelo^{5,12,36}.

Bicamadas lipídicas artificiais podem ser preparadas com composição definida assemelhando-se a membranas naturais em sua estrutura³⁷. As características destas membranas podem ser estudadas quanto à dependência de: temperatura, pH, concentração salina e mesmo de sua própria composição. Sob determinadas condições, os lipídios que compõem bicamadas sofrem mudanças de fase (gel/líquido cristal) na qual se alteram as distâncias médias entre as moléculas de lipídio, a sua mobilidade e a frequência de conformação "cis" nos ácidos graxos. As características de permeabilidade a ions variam com a natureza do lipídio, as mudanças de fase, o potencial de superfície, a natureza do contra-ion, entre outros fatores^{22.23.37}.

A utilização de modelos de membrana não é o único recurso para a determinação da permeabilidade de membranas ao O_2^- . A metodologia disponível para geração de O_2^- , em meio aquoso, não inclui nenhum método de uso geral. Devido ao rápido decaimento do O_2^- , a alternativa ao uso de soluções extremamente alcalinas de KO_2 é o emprego de estabilizadores como éteres de coroa ou de sistemas que geram continuamente o O_2^- em solução. Entre estes incluem-se: a redução do O_2 nas superfícies de um eletrodo gotejante de mercúrio, em uma solução

contendo óxido de trifenil fosfina, ou de um catodo de platina; a reação da enzima Xantina oxidase com uma série de substratos; a irradiação de flavinas e, ainda, a autooxidação de pirogalol^{21,57}. Com a finalidade de estabelecer uma metodologia adequada aos estudos de permeabilidade de membranas, escolhemos a fotólise de riboflavina^{27,42,43,45,57,58,60,61,67} para geração de O_2^- . Este método de geração é de fácil manuseio e, para iniciar ou interromper o processo no sistema compartimentalizado, o controle independe da adição de reagentes.

A detecção de O_2^- também é dificultada pelo fato de muitas das substâncias presentes nos sistemas biológicos absorverem na mesma região do espectro, impedindo a realização de medidas diretas⁵⁰. Também neste caso não existem detetores de uso geral. Todas as reações usualmente empregadas para este fim - por exemplo a redução do Citocromo c ⁵¹ e de diversos sais de tetrazólio^{1,2,4,6,7}, e a oxidação de adrenalina a adrenocromo⁵⁷ - são sujeitas a interferentes e a maioria delas processa-se em diversas etapas. Dentre estas, a redução de Citocromo c e do "Nitro Blue Tetrazolium" (NBT) são as mais utilizadas. A redução do Citocromo c em solução aquosa é observada pela variação da absorbância a 550nm,

onde a diferença nos coeficientes de extinção molar das formas reduzida e oxidada é de cerca de $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ²⁷. A redução do NBT pode ser, na maioria dos casos, observada pela variação da absorbância a 560nm ⁶. O espectro de absorção do NBT em solução aquosa apresenta uma única banda intensa com máximo correspondente a um coeficiente de extinção molar de $64000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ em 260nm e nenhuma absorção na região visível. A redução do NBT à sua diformazana (DF)⁴³ ocorre em uma sequência de quatro etapas monoelétrônicas, com a formação de um intermediário estável, dirreduzido e solúvel em água, a monoformazana (MF), que tem um coeficiente de extinção molar, em solução aquosa, a pH 9,5-11,0 de $(25.400 \pm 1200) \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e a pH 5,7-6,7 de $(12.800 \pm 640) \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ⁹. O NBT não é empregado somente para a detecção de O_2^- em solução: sua ampla utilização como indicador de sítios de oxiredução em Histologia^{1,2,4,14,20,65} ou na revelação de eletroforeses de enzimas com atividade dismutásica²⁴ deve-se principalmente à baixa solubilidade em água e ao alto coeficiente de extinção molar na região do visível, característicos da sua diformazana²⁰. A redução do NBT a MF foi o sistema detetor escolhido visto que o NBT é bastante solúvel em água, facilitando a inclusão em vesículas, além de possuir uma alta

constante de velocidade de reação com o O_2^- e ser, ainda, menos sensível à reoxidação que o Citocromo c^{18-32} .

2. OBJETIVOS

2.1. Padronizar uma metodologia para geração e detecção do ânion superóxido;

2.2. Verificar efeitos de superfície sobre o sistema experimental estabelecido, em um sistema modelo de interface;

2.3 Determinar a permeabilidade de membranas artificiais modelo ao ânion superóxido.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1. Corantes e reagentes

-Nitro Blue Tetrazolium (NBT) (Sigma Chemical Co., St.Louis, Missouri, USA) recristalizado três vezes, a frio, pela adição de metanol a uma solução em acetato de etila⁴⁰. As soluções foram mantidas ao abrigo da luz.

-Orange G (QEEL, São Paulo, Brasil) utilizado em solução aquosa $5 \times 10^{-5}M$ contendo Brij35 0,1M e NaCl 0,1M .

-Riboflavina (Fluka AG Buchs SG, Switzerland) em solução aquosa estoque $1,36 \times 10^{-4}M$ mantida em frasco escuro, em geladeira, até o momento de uso.

-Etilenodiaminotetracetato de sódio (EDTA) (Reagen Quimibrás Ind.Quim. S.A., São Paulo, Brasil) em solução aquosa 0,15M.

-Metionina, da (Sigma Chemical Co., St.Louis, Missouri, USA) em solução aquosa 20mM.

3.1.2. Lipídios e detergentes

-Polioxietileno 23-lauriléter (Brij35) (Calbiochem, USA) e Octilfenóxi polietoxietanol (Triton X100) (Sigma Chemical Co., St.Louis, Missouri, USA).

-Brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB) (E. Merck AG Darmstadt, Deutchland) recristalizado tres vezes, à partir de uma solução em acetona/etanol

(85:15v/v) e seco sob vácuo.

-Cloreto de hexadeciltrimetilamônio (CTACl) preparado à partir de CTAB, por troca iônica em coluna de Dowex 21K-cloreto (Serva Feinbiochemica, Heidelberg).

-Dodecilsulfato de sódio (SDS) grau de pureza "especial" (BDH chemicals Ltd., Poole, England).

-Cloreto de dioctadecildimetilamônio (HERQUAT), (Herga Indústria Química S.A., São Paulo, Brasil) na forma de pasta, contendo uma mistura de cloreto de dialquilamônio (75% C18 e 25% C16). O material foi seco sob vácuo e extraído com éter etílico em Soxhlet por dois dias. A fração sólida foi recristalizada por 6 vezes de acetona, seca sob vácuo e submetida a análise por espectrometria de massa e por cromatografia gasosa. A composição final do lipídio segundo o número de cadeias mostrou ser: 75% C18/C18, 23% C18/C16 e 2%C16/C16 ¹⁷.

-Dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC) (Sigma Chemical Co., St.Louis, Missouri, USA).

-Lecitina de gema de ovo obtida segundo Singleton⁷⁴.

3.1.3. Solventes

-Éter livre de peróxidos, destilado e seco; clorofórmio e metanol destilados; acetato de etila, tetrahidrofurano, dimetilformamida e piridina com

grau de pureza analítico, água bidestilada (em bidestilador de vidro).

3.1.4. Soluções tampão

-Ácido bórico (Reagen Quimibrás Ind. Químicas S.A., São Paulo, Brasil) em solução aquosa 50mM pH8,2.

-Fosfato de sódio monobásico (Carlo Erba, São Paulo, Brasil) e fosfato de sódio dibásico (May & Baker, Dagenham, England) em solução aquosa 50mM pH7,6.

Para ensaios de efeito do pH as soluções acima foram usadas nas faixas de pH 6,5 a 8,0 (fosfato) e de 8,0 a 10,5 (borato).

3.1.5 Gel para cromatografia

-Sephadex G50, (Sigma Chemical Co., St.Louis, Missouri, USA) foi hidratado em tampão por uma noite à temperatura ambiente, deaerado sob vácuo e utilizado em colunas de $\approx 1,5$ cm de diâmetro por ≈ 15 cm de altura.

3.1.6. Aparelhagem

O equipamento para fotólise foi montado para permitir a irradiação da amostra em uma cubeta de 1cm de caminho ótico. A cubeta foi colocada no interior de uma cela com fenda de $0,98\text{cm}^2$, termostatizada por um banho circulador, sobre um agitador magnético. Manteve-se uma distância de ≈ 8 cm entre a lâmpada (OSRAM halogênio 1: 12V/55W) e

o centro da cubeta; empregando-se uma lente biconvexa para obter a imagem nítida do filamento da lâmpada a esta distância e um filtro Corning CS-3-72 2,93mm para que somente comprimentos de onda maiores do que 420nm atingissem a cubeta.

Os espectros de absorção foram medidos em espectrofotômetros Beckman modelo 25 e Beckman modelo DU-7, ambos com controle de temperatura. Os espectros de fluorescência foram obtidos num fluorímetro Perkin-Elmer modelo LS-5.

As determinações de pH foram feitas em aparelho equipado com um eletrodo combinado de vidro Digimed, modelo DMPH-3.

Foram ainda utilizados: coletor automático de frações Buchler, modelo alpha-200; sonicador Braunsonic 1510 com ponta de titânio; evaporador rotatório Buchler; agitador mecânico tipo vórtex, marca Lab-line Instruments, modelo Super-mixer 1290; banho maria; cronômetro digital Technos e termômetros graduados.

3.2. Métodos

3.2.1 Obtenção das vesículas

A permeabilidade de bicamadas ao ânion superóxido foi estudada em vesículas unilamelares grandes (LUV). Métodos de obtenção de LUVs incluem evaporação em fase reversa e injeção etérea (lecitina de ovo e DMPC) ou clorofórmica (HERQUAT).

3.2.1.1.Preparação de vesículas por evaporação de fase reversa.

Dissolveu-se em éter o lipídio que iria constituir as LUVs, transferiu-se a solução para tubos de ensaio e evaporou-se o éter sob fluxo de argônio ou nitrogênio saturados com H_2O , formando um filme do lipídio na parede dos tubos. Cada um destes continha cerca de 10mg de lipídio por ml de preparação final de vesículas. Este filmes foram submetidos a vácuo, para a remoção de qualquer resíduo de éter e armazenados em congelador a $-10^{\circ}C$.

Quando da preparação das LUVs, o lipídio foi redissolvido em éter. O meio aquoso, contendo as substâncias a incluir nas LUVs, foi colocado sobre a mistura, que foi agitada vigorosamente num vórtex e submetida a ultrassom num sonicador de ponta, por poucos minutos, para que se formasse uma suspensão estável. Manteve-se proporção entre a fase etérea e a fase aquosa em três para um. O volume da fase aquosa define o volume final da preparação de vesículas. A suspensão foi rapidamente colocada em um balão em forma de pera e evaporada sob vácuo, a $40^{\circ}C$ num evaporador rotatório. As LUVs estão prontas para uso após a remoção de todo o éter da suspensão⁸⁰.

3.2.1.2. Preparação de vesículas por injeção

Uma solução aquosa contendo as substâncias que se desejavam incluir nas LUVs foi mantida no interior de uma cela cilíndrica, termostatizada a uma temperatura ligeiramente superior à de ebulição do solvente utilizado na injeção. Uma solução do lipídio no solvente escolhido foi injetada lentamente (1ml/min) nesta solução aquosa. Durante a injeção manteve-se um fluxo de argônio ou nitrogênio saturados com H_2O pela suspensão, até que se tivesse removido todo o solvente injetado com o lipídio. Este procedimento é suficiente para a obtenção de LUVs¹⁷.

Para que as moléculas do lipídio organizassem-se de forma mais regular nas membranas, empregou-se um recurso adicional denominado anelamento: a incubação das vesículas durante uma hora em banho maria, poucos graus acima da temperatura de transição de fase (T_c) do lipídio na bicamada.

Nos experimentos com vesículas injetadas de HERQUAT, bem como nos seus controles, a concentração de NBT na solução de partida foi mantida em 1,5mM e a concentração do lipídio na solução injetada, em 20mM.

Para que as LUVs contendo NBT pudessem ser empregadas nos experimentos de permeabilidade, foi necessário remover-se o NBT externo. Para tal,

procedeu-se a uma cromatografia em gel de Sephadex G50. As vesículas coletadas foram reunidas num único tubo e utilizadas.

O conteúdo de NBT nas vesículas foi medido espectrofotometricamente após a destruição das membranas com CTAB 0,1M. O conteúdo de HERQUAT foi determinado espectrofotometricamente pela diminuição da absorbância do corante OrangeG⁷⁰.

As vesículas foram utilizadas num período não superior a doze horas, inclusive para as determinações de conteúdo de lipídio e de NBT. Vesículas de HERQUAT com NBT incluído não vazaram seu conteúdo no período de 3 dias como determinado espectrofotometricamente após nova filtração em gel de Sephadex G50.

3.2.2. Ensaio de fotólise

Misturas de reação contendo riboflavina $1,36 \times 10^{-5}M$; EDTA 20mM; NBT $3,97 \times 10^{-5}M$ e tampão 50mM, em diferentes pH, foram utilizadas nos ensaios, na presença e na ausência de micelas. Nos experimentos com micelas, Brij35, Triton X100, CTACl e SDS foram usados para investigar efeitos de carga de superfície. Efeitos de concentração foram estudados variando, da mistura padrão, apenas a concentração do componente testado. No caso dos detergentes, Brij35 e CTACl foram empregados na faixa de concentrações de 10^{-5} a $10^{-1}M$. Os estudos de efeito

de pH foram realizados em micelas de CTACl 3mM.

Para a determinação da permeabilidade de vesículas ao O_2^- , misturas de reação com uma concentração total de NBT, contido nas vesículas de HERQUAT, de $6,2 \times 10^{-5}M$. A concentração final de riboflavina foi a mesma dos experimentos em solução e em micelas. Como estas vesículas são instáveis à força iônica maior do que 5mM, a concentração do tampão externo foi ajustada para este valor. A metionina, em concentração de 2mM, foi empregada como redutor, ao invés de EDTA.

Aliquotas de 2ml das misturas de reação foram irradiadas em cubetas de quartzo de faces paralelas com 1cm de caminho óptico. A irradiação foi conduzida em intervalos medidos de tempo de 10s aproximadamente, durante os primeiros minutos de reação. Após isto, intervalos de tempo mais longos foram empregados. Durante a fotólise, a solução permaneceu sob agitação. Após cada intervalo de tempo, espectros de absorção foram determinados utilizando-se como linha base o espectro de absorção da mesma mistura de reação antes da fotólise. A velocidade de varredura foi ajustada para 1200nm/min para minimizar a interferência da lâmpada do aparelho na fotólise. Cada experimento foi repetido no mínimo uma vez. Pelo menos dez

espectros de absorção foram obtidos para cada amostra.

As constantes de velocidade de reação para a redução do NBT por concentrações mantidas de O_2^- , de primeira ordem aparente, foram calculadas utilizando-se um programa de ajuste não linear por um método de mínimos quadrados⁴².

3.2.3. Verificação da permeabilidade de LUVs ao O_2^-

A permeabilidade de LUVs de HERQUAT foi estudada em duas temperaturas, uma abaixo (25°C) e outra acima (45°C) da temperatura de transição de fase do lipídio na bicamada (37°C). A uma suspensão de LUVs com NBT no compartimento interno foram adicionados uma alíquota de uma solução de KO_2 ou os componentes do sistema gerador como indicado no item 3.2.2., como fontes de O_2^- no compartimento externo. A absorbância das misturas de reação a 530nm foi usada para calcular as constantes de velocidade para o processo que resultou na redução do NBT.

Foram feitos controles do efeito da presença de vesículas usando LUVs preparadas sem NBT e adicionando-se tanto o sistema gerador ou o KO_2 quanto o NBT no compartimento externo. Controles da permeabilidade da bicamada ao NBT e à riboflavina foram efetuados com pré-incubações de 1h a 25°C ou

a 45°C, conforme o seguinte esquema :

Esquema	Condições de pré-incubação	Ensaio de fotólise		
		Adição após a pré-incubação	T, °C	Objetivo
NBT R	—	—	25	Controle
			45	
NBT R	—	—	25	Controle
			45
1h, 25°C	riboflavina	25	Verificar a permeação da bicamada por NBT
	1h, 45°C			
	1h, 25°C	—	25	Verificar a permeação da bicamada por riboflavina
	1h, 45°C			
R	1h, 45°C	—	45	Controle de estabilidade da mistura de reação
	—	—	25	Determinar a permeabilidade ao O ₂ a 25°C
			45	Determinar a permeabilidade ao O ₂ a 45°C

4. RESULTADOS

4.1. Sistema gerador de O_2^-

Soluções aquosas de O_2^- foram obtidas à partir da dissolução de seu sal de potássio (KO_2) ou da fotólise de riboflavina:

- A velocidade de desaparecimento do O_2^- obtido pela dissolução de KO_2 em meio aquoso observada diretamente, medindo-se a diminuição da absorbância do O_2^- a 250nm, não mudou apreciavelmente na presença de micelas ou de vesículas (Fig.1). As concentrações iniciais efetivas de O_2^- obtidas com quantidades de KO_2 da ordem de miligramas de sal correspondem a rendimentos de $\approx 1\%$ considerando-se o coeficiente de extinção molar do O_2^- em solução igual a $2,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ⁵⁰.

- A fotólise de riboflavina gera O_2^- em meio aquoso segundo um sistema de reações catalisado por luz. Os resultados das medidas de intensidade de fluorescência de riboflavina na presença e na ausência de EDTA, de O_2 ou de ambos, realizadas para a determinação das reações participantes do sistema gerador, encontram-se na Tabela I. Nas soluções deaeradas a fluorescência diminuiu indicando que houve consumo de riboflavina. A fotólise de soluções deaeradas resultou num rendimento de MF maior que a fotólise de soluções aeradas de composição análoga. Na ausência de

Fig.1 - Cinéticas de decaimento de O_2^- , medidas pela diminuição da absorbância a 250nm, em tampão borato 50mM pH9.5 (.....) e em tampão borato 50mM pH9,5 contendo CTACl 2,5mM (—) ou vesículas vazias de HERQUAT (---). Os valores de $t_{1/2}$ para os decaimentos ilustrados foram de 4,35s; 4,8s; e 4,75s respectivamente.

Tabela I

Estudo das reações componentes do sistema gerador de O_2^- por
fotólise de riboflavina

Condição testada	Intensidade relativa de fluorescência de riboflavina ^a	Rendimento de MF
Controle ^b	1,00
Ausência de O_2	0,54
Ausência de EDTA	0,99
Ausência de EDTA + O_2	0,50

^a medidas realizadas após 5min de irradiação, relativas à fluorescência da amostra não irradiada.

^b misturas de reação contendo riboflavina $1,36 \times 10^{-5}M$; EDTA 20mM; NBT $3,97 \times 10^{-5}M$ e tampão fosfato pH 7,6 50mM.

EDTA observou-se um ligeiro decréscimo na intensidade de fluorescência da riboflavina. A ausência de EDTA em soluções aeradas associou-se, entretanto, a uma grande diminuição do rendimento de MF, que foi detetável, no limite de sensibilidade, pelos aparelhos utilizados.

4.2. Efeito de interfaces sobre a geração de O_2^-

Os resultados das medidas de rendimento de MF e de intensidade de fluorescência de riboflavina na presença e na ausência de EDTA, de O_2 ou de ambos, realizadas na presença de micelas, estão mostrados na Tabela II. Assim como nos ensaios realizados na ausência de micelas, a fotólise de soluções deaeradas resultou em maior rendimento de MF e diminuição da intensidade de fluorescência da riboflavina e a fotólise de soluções sem EDTA resultou em diminuição do rendimento de MF e ligeiro decréscimo na intensidade de fluorescência da riboflavina. A comparação dos resultados obtidos na presença e na ausência de micelas sugere que tanto o consumo de riboflavina quanto o rendimento de MF são ligeiramente maiores na presença de micelas.

Tabela II

Estudo das reações componentes do sistema gerador de O_2^- por fotólise de riboflavina na presença de micelas ^{a)}

Condição testada	Intensidade relativa de fluorescência ^{b)}	Rendimento de MF
Controle ^{c)}	1,00
Ausência de O_2	0,50
Ausência de EDTA	0,98
Ausência de EDTA + O_2	0,40

^{a)} Brij35 2mM.

^{b)} medidas realizadas após 5min de irradiação, relativas à fluorescência da amostra não irradiada.

^{c)} misturas de reação contendo riboflavina $1,36 \times 10^{-5}M$; EDTA 20mM; NBT $3,97 \times 10^{-5}M$; Brij35 2mM e tampão fosfato pH 7,6 50mM.

4.3. Sistema detetor de O_2^-

A adição de KO_2 a uma solução tamponada contendo um excesso de NBT resultou na formação de um produto cujo espectro de absorção apresenta uma banda larga na região do visível com máximo na região de 560nm (Fig.2). Este espectro corresponde ao descrito anteriormente para a MF^* . A absorbância da mistura de reação não variou ao longo do tempo e aumentou linearmente com a concentração de KO_2 empregada na reação (Fig.2, inserção).

Quando o O_2^- foi produzido por irradiação da riboflavina em soluções aeradas contendo EDTA e NBT, as características espectrais do produto obtido novamente correspondem às descritas para a MF . A presença de um único ponto isosbético a 302nm (Fig.3), sugere que, sob estas condições, a MF foi o único produto formado. A redução do NBT durante os ensaios de fotólise, monitorada por espectroscopia diferencial, está ilustrada na Fig.3. Observou-se um aumento gradual do produto e uma diminuição do NBT que puderam ser ajustados a uma cinética de primeira ordem (Fig.3, inserção).

Nem sempre foi possível acompanhar a reação até o seu término. Dependendo das condições utilizadas, ocorreu precipitação antes que se pudesse visualizar o término da reação; na presença de micelas foi possível acompanhar

Fig.2 - (A) Espectro de absorção do produto da reação entre NBT 39,7mM e K_2O_2 (concentração efetiva $\approx 10^{-5}M$) em tampão borato 50mM pH8.2. (B) Efeito de concentração de K_2O_2 sobre o rendimento da redução do NBT, medido pela variação de absorbância a 530nm.

Fig.3 - Espectros de absorção da mistura de reação após a fotólise, medidos contra branco constituído pela mesma mistura de reação não irradiada. De baixo para cima, considerando a banda de absorção na região de luz visível, os espectros correspondem a tempos de irradiação crescentes de 1 até 10min, cada espectro representando um tempo total de irradiação 1min maior que o antecedente. Na cubeta, NBT 39,7mM, Riboflavina $1,36 \times 10^{-5}M$, EDTA 20mM, CTACl 4,3mM e tampão borato pH8,2 50mM. Inserção: Conjunto completo dos valores de absorbância a 530nm correspondentes aos espectros medidos durante o experimento ilustrado na Fig.3, $\circ$, e respectivo ajuste cinético (—).

a reação até que não se observasse mais nenhuma mudança na absorbância do produto, enquanto que em solução verdadeira, ocorria precipitação antes que o infinito fosse atingido.

4.4. Efeitos de interfaces sobre a detecção de O_2^-

- Efeitos sobre as características espectrais dos componentes do sistema detetor:

As características espectrais do NBT não foram afetadas pela presença de detergentes não iônicos e catiônicos na solução e nem por mudanças de temperatura (resultados não apresentados).

A MF, obtida à partir da redução do NBT com ascorbato em solução etanólica^{2.20} ou com O_2^- em meio aquoso contendo ou não interfaces, apresentou um máximo de absorção na região de 530-560nm (Fig.4). O espectro de absorção da MF no visível mudou sua forma e apresentou deslocamento de máximo dependendo da composição da solução (Fig.2 e Fig.4). O espectro de absorção da MF obtido em solução aquosa assemelha-se ao obtido na presença de micelas de CTACl ou de vesículas de HERQUAT (medido à temperatura ambiente, abaixo da temperatura de transição de fase do lipídio). Aquele obtido em micelas de Brij35 ou de vesículas de lecitina

Fig.4 - Espectros de absorção da monoformazana do NBT (MF) em etanol (.....), em Brij35 3,5mM (---) e em CTACl (—). A MF foi obtida em solução etanólica por redução com uma solução aquosa neutra de ascorbato e em solução micelar por redução com KIO_3 (concentração efetiva $\approx 10^{-3}\text{M}$).

Fig.5 - Efeito de temperatura sobre o espectro de absorção da monoformazana do NBT (MF) na presença de vesículas de HERQUAT. A MF foi obtida à partir de NBT adicionado ao compartimento externo de uma suspensão de vesículas vazias de HERQUAT, por redução com $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$. Espectros de uma mesma preparação: a 25°C (—), a 45°C (---) e a 25°C, após resfriamento(.....).

assemelha-se ao obtido em etanol, quando o NBT é reduzido por ascorbato em meio neutro.

Na presença de vesículas de HERQUAT, o espectro de absorção da MF mudou sua forma com a variação da temperatura de uma maneira reversível (Fig.5). A temperaturas mais altas do que a temperatura de transição do lipídio, a banda de absorção na região do visível - máximo em 530nm - alargava-se até 700nm, formando um grande patamar sem máximos locais.

- Efeitos sobre a estabilidade dos componentes do sistema detetor

Micelas de Brij35, TritonX100, CTAB ou CTACl não modificaram a estabilidade do NBT em solução - a absorbância de uma solução de NBT não variou e o espectro de absorção não mudou de forma com o tempo, em meio contendo estes detergentes (resultados não apresentados). A adição de SDS ao meio de reação provocou o aparecimento de um precipitado que só foi solubilizado acrescentando-se grandes quantidades do detergente.

A adição de fosfatidilcolinas a uma solução de NBT resultou na redução espontânea do mesmo a MF. O processo foi mais rápido com lecitina de ovo purificada do que com DMPC comercial e mostrou-se independente da existência de agregados, visto que ocorreu tanto em solução aquosa quanto

Fig.6 - Efeito de variação na concentração de riboflavina sobre a constante de velocidade de primeira ordem aparente (k) de formação de monoformazana (MF) na presença (●) e na ausência (○) de CTACl 3,2mM. Misturas de reação contendo EDTA 20mM, NBT $3,97 \times 10^{-4}$ M e tampão fosfato pH7,6.

clorofórmica. Nenhuma reação ocorreu à adição de HERQUAT, na presença do qual o NBT permaneceu estável por mais de uma semana, usando como critério o seu espectro de absorção.

4.5. Ajuste dos dados cinéticos:

As cinéticas de reação foram estudadas pelo aumento da absorbância da MF a 530nm ou pela diminuição da absorbância do NBT a 260nm (Fig.3). Como a MF também absorve na região de 260nm, o cálculo da constante de velocidade para a diminuição do NBT foi efetuado subtraindo a contribuição da formação de MF. Num mesmo ensaio, as constantes de velocidade de reação (k_{r}) calculadas para o consumo de NBT ($k_{260\text{nm}}$) ou para a formação de MF ($k_{530\text{nm}}$) têm o mesmo valor, evidenciando que apenas a diminuição do NBT é importante nestas condições (por exemplo, no ensaio mostrado na Fig.3, $k_{260\text{nm}} = 3,3 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ e $k_{530\text{nm}} = 3,5 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$).

Em todos os ensaios nós pudemos prever os valores de absorbância para o término da reação, que concordavam com os valores medidos nos ensaios em que não ocorreu precipitação ou com os valores calculados com base na concentração inicial de NBT e nos coeficientes de extinção molar de MF nos ensaios em que, devido à precipitação, não foi

possível medir o valor de absorbância no término da reação.

4.6. Curvas padrão de O_2^-

A curva padrão determinada pela adição de um volume conhecido da solução estoque de KO_2 é, na realidade, uma "curva padrão aparente", em que os valores de concentração foram relatados em termos da massa de KO_2 usada para preparar as soluções estoque de O_2^- (Fig.2, inserção). A quantidade de O_2^- efetivamente usada na reação depende criticamente do procedimento experimental. A concentração de O_2^- na solução estoque é determinada por diversas variáveis cujo controle preciso é impossível.

A dependência da concentração mantida de O_2^- , determinada pela concentração de riboflavina na mistura de reação está ilustrada na Fig.6. A redução de NBT mostrou dependência linear com concentração de riboflavina, confirmando que a reação entre o O_2^- e o NBT tem um comportamento de primeira ordem aparente e que o sistema gerador manteve uma concentração de O_2^- constante durante os períodos de irradiação.

4.7. Efeitos de interface sobre a velocidade da reação NBT/ O_2^-

A variação da concentração de Brij35 ou de CTACl na mistura de reação abaixo e acima da

Tabela III

Efeito da concentração de detergentes sobre a constante de primeira ordem aparente para a redução do NBT por O_2^{2-} ^a

[O_2^{2-}], mM	$k_{app} \cdot 10^3 s^{-1}$	
	CTACl	Brij-35
50,00	5,6	
10,00	5,1	6,4
5,00	4,8	5,3
1,00	4,4	3,9
0,50	4,2	5,1
0,10	4,3	3,0
0,05	5,6	4,0
0,01	4,5	4,2

^a misturas de reação contendo riboflavina $1,36 \times 10^{-5} M$; EDTA 20mM; NBT $3,97 \times 10^{-5} M$ e tampão borato pH8,2 50mM.

concentração micelar crítica não produz efeito apreciável sobre a velocidade de reação (Tabela III). Nenhuma reação é observada na presença do detergente aniônico SDS, nem mesmo em concentrações de SDS suficientes para solubilizar o precipitado que se forma inicialmente (resultados não apresentados).

As constantes de velocidade de reação obtidas na presença e na ausência de micelas apresentam comportamento idêntico quanto à dependência de concentração de riboflavina (Fig.6).

Soluções micelares também não apresentam efeitos importantes de pH sobre k_{530nm} , na faixa de 6,5 a 10,0 (Tabela IV).

4.8. Permeabilidade de vesículas unilamelares grandes de HERQUAT ao O_2^-

A fotólise de riboflavina adicionada externamente a uma suspensão de LUVs contendo NBT incluído resultou numa pequena variação no espectro de absorção da mistura de reação quando a temperatura de 25°C foi mantida. Quando o mesmo procedimento foi efetuado a 45°C o espectro da mistura modificou-se pelo aparecimento gradual de uma absorção na região da MF. Os resultados estão sumarizados na Tabela V. Como os controles de permeação de riboflavina a 45°C mostraram que a própria riboflavina permeia a bicamada nesta

Tabela IV

Efeito de pH sobre a redução do NBT em solução micelar^{a)}

pH	$k_{530nm} \cdot 10^3 s^{-1}$
6,0	3,8
6,5	5,3
7,0	6,0
8,0	7,8
8,2	5,0
8,5	4,3
9,0	3,8
9,5	3,2
10,0	3,0

^{a)} misturas de reação contendo riboflavina $1,36 \times 10^{-5} M$; EDTA 20mM; NBT $3,97 \times 10^{-5} M$; CTACl 4,3mM e tampão borato pH8,2 50mM.

Tabela V

Estudo da permeabilidade de bicamadas de HERQUAT ao O_2^-
gerado continuamente em solução

Condição testada ^a	$k_{530nm}, 10^{2}s^{-1}$	
	25°C	45°C
NBT em solução	0,75	1,32
Vesículas com NBT no compartimento externo	0,87	1,44
Vesículas com NBT incluído: sem pré-incubação	0,30	1,52
pré-incubadas 1h a 25°C	0,49	
pré-incubadas 1h a 45°C	0,01	
pré-incubadas 1h com riboflavina no compartimento externo a 25°C	0,24	
pré-incubadas 1h com riboflavina no compartimento externo a 45°C	1,36	1,94

^a misturas de reação contendo riboflavina $1,36 \times 10^{-5}M$; EDTA 20mM; NBT $3,97 \times 10^{-5}M$; HERQUAT $5 \times 10^{-5}M$ e tampão borato pH 9,5 50mM.

temperatura, a permeação pelo O_2^- não forneceu resultados conclusivos por este método de geração. A 25°C e a tempos longos de irradiação, mesmo os valores de rendimento de MF usados para calcular as constantes de velocidade para o processo são, portanto sujeitos a erro.

A adição de KO_2 a uma suspensão de LUVs contendo NBT incluído não foi seguida de nenhuma alteração na absorbância da suspensão quando efetuada a 25°C. A esta temperatura, quantidades equivalentes de O_2^- reduziram o NBT presente em solução ou adicionado externamente a uma suspensão de vesículas contendo apenas tampão em seu compartimento externo. A adição de KO_2 a uma suspensão de LUVs contendo NBT incluído a 45°C resultou num aumento da absorbância a 530nm equivalente ao obtido quando as mesmas concentrações de NBT e KO_2 reagiam em solução ou no compartimento externo de uma suspensão de vesículas de HERQUAT a esta temperatura (Tabela VI).

Não foi possível acompanhar, com os métodos utilizados, a cinética da permeação das bicamadas pelo O_2^- a 45°C usando soluções de KO_2 por ela ser muito rápida.

Tabela VI

Estudo da permeabilidade de bicamadas de HERQUAT ao O_2 -obtido
através da dissolução de KO_2

Condição testada ^{a,b}	Absorbância da mistura de reação após a adição de KO_2 ^a	
	25°C	45°C
NBT em solução	0,288	0,330
Vesículas com NBT no compartimento externo	0,550	0,510
Vesículas com NBT incluído	0,036	0,370

^a Concentração inicial de KO_2 na cubeta $\approx 10^{-4}M$

^b misturas de reação contendo NBT $3,97 \times 10^{-5}M$; HERQUAT $\approx 5 \times 10^{-5}M$ e tampão borato pH 9,5 50mM.

11833

5. DISCUSSÃO

5.1. Método analítico para O_2^-

Um método analítico para a determinação do O_2^- requer uma reação rápida, sensível e que deve competir favoravelmente com a dismutação do O_2^- e com outras reações que contribuam para o seu rápido decaimento em solução. O produto deve ser facilmente detectável e os limites de aplicabilidade conhecidos. Eventuais interferências, previsíveis devidas às condições em que se deseja aplicar o método, devem ser testadas - por exemplo a estabilidade dependente de pH e efeitos devidos à presença de interfaces, inevitáveis em amostras biológicas.

A obtenção de O_2^- em meio aquoso por meio de dois procedimentos diferentes permitiu comparar o comportamento do método de detecção em duas situações distintas muito bem definidas: a dissolução de KO_2 , em que apenas a quantidade máxima de O_2^- em solução pode ser estimada, e a geração por fotólise de riboflavina, em que a concentração do ânion radical é mantida no meio de reação.

A fotólise de riboflavina fornece, portanto, uma situação experimental mais simples do ponto de vista da análise dos dados cinéticos da reação entre O_2^- e detetor, porque esta comporta-se como

uma reação de primeira ordem, uma vez que a concentração de O_2^- é constante ao longo do tempo em que ocorre a fotólise e durante o qual o NBT reage. Porém, como o NBT pode ser reduzido por outra espécie química que não o O_2^- , como mostrado pelo aparecimento de MF nos ensaios feitos com soluções degaseadas, é necessário conhecer as diversas reações envolvidas no processo de geração. A fotólise de flavinas produz espécies redutoras em meio aquoso^{27.38.43.45.57.60.61}, por isto é importante assegurar-se que, em soluções aeradas, o O_2^- é a única espécie responsável pela redução do NBT. Os resultados mostrados na Tabela I permitem dizer que em soluções aeradas contendo EDTA, a riboflavina transfere elétrons do EDTA para o O_2 , e não reage diretamente com o NBT em proporções detectáveis pelos métodos empregados. A geração de O_2^- a partir da fotólise de riboflavina pode ser representada segundo o esquema I:

R: riboflavina; R^1 : estado excitado singlete da riboflavina;
 R^3 : estado excitado tripleto da riboflavina; R_{ox} : riboflavina oxidada; HR^2 : intermediário semirreduzido da riboflavina

Esquema I

As reações envolvidas na geração de O_2^- à partir da fotólise de riboflavina seriam : a formação do estado excitado singlete, por absorção de luz; a geração do estado excitado triplete, por cruzamento intersistemas; a reação com um doador de elétrons, no caso o EDTA, com a conseqüente formação de um intermediário semirreduzido e a redução do O_2 por este intermediário, com formação de O_2^- e regeneração da riboflavina. Outros processos estariam ocorrendo na mistura de reação, por exemplo a supressão do estado excitado triplete da riboflavina por O_2 . Na ausência de EDTA, a própria riboflavina, por auto-redução, forneceria o intermediário semirreduzido. Em soluções deaeradas este intermediário seria capaz de transferir elétrons para o NBT.

Os principais elementos que permitem propor que a geração de O_2^- ocorra segundo o esquema I são:

- em soluções aeradas sem EDTA, a um rendimento de MF muito baixo, associa-se um ligeiro decréscimo na concentração de riboflavina (Tabelas I e II), demonstrando que o EDTA é importante na geração da forma semirreduzida, evitando a auto-redução da riboflavina;

- em soluções degaseadas e portanto na ausência de O_2 , quando não é possível a produção de O_2^- , a

riboflavina é sempre consumida, mesmo quando o EDTA está presente na mistura de reação (Tabelas I e II), demonstrando que, além da auto-redução da riboflavina, a reação direta da forma semirreduzida com o NBT também leva à oxidação da riboflavina, com conseqüente diminuição na intensidade de fluorescência;

- o rendimento de MF é maior nas soluções degaseadas do que nas aeradas de composição análoga (Tabelas I e II), sugerindo que a supressão do estado triplete da riboflavina pelo O_2 é importante nas soluções aeradas ou que produtos da auto-redução da riboflavina são capazes de reduzir o NBT a MF, ou ambos.

- as soluções aeradas contendo EDTA como doador sacrificial de elétrons não apresentaram consumo apreciável da riboflavina (Tabelas I e II), porque esta é reciclada durante a redução do O_2 pelo intermediário semirreduzido. Em soluções aeradas, a redução do O_2 é, pois, muito mais importante que a redução direta do NBT pelo intermediário semirreduzido;

- a constante de velocidade de primeira ordem aparente para a redução do NBT no sistema de geração por fotólise de riboflavina é diretamente proporcional à concentração desta última (Fig.6),

demonstrando que a concentração de O_2^- é realmente mantida durante a irradiação da cubeta.

O funcionamento proposto para o sistema gerador acoplado à detecção com o NBT, nas diversas situações testadas, está mostrado no esquema II

Assim, na presença de todos os componentes do sistema gerador (Esquema IIA), a riboflavina é reciclada e o O_2^- é a única espécie responsável pela redução do NBT. Nas soluções degaseadas contendo EDTA (Esquema IIB), a riboflavina não é reciclada e a redução do NBT é feita pelo intermediário semirreduzido da riboflavina. Na ausência de EDTA em soluções aeradas (Esquema IIC), o triplete da riboflavina decai principalmente pela supressão por O_2 e a auto-redução da riboflavina forma uma pequena quantidade do intermediário semirreduzido, capaz de reduzir o O_2 a O_2^- , o qual reage com o NBT. Na ausência de EDTA em soluções degaseadas (Esquema IID), o triplete da riboflavina forma o intermediário semirreduzido que reduz diretamente o NBT, consumindo a riboflavina.

Em presença de NBT, a concentração do detetor e a constante de velocidade para a detecção também determinam a velocidade de decaimento do O_2^- . As reações que conduzem à formação da MF estão mostradas abaixo:

A velocidade de formação de MF é limitada pela velocidade da reação do NBT com o O_2^- - constante de velocidade $k_{VI} = (5,88 \pm 0,12) \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$. A reação de desproporcionamento do monoradical do NBT é controlada por difusão.

Para que seja possível medir concentrações absolutas do O_2^- em solução é necessário que a redução do NBT pelo O_2^- possa competir favoravelmente com as outras reações que conduzem ao decaimento do O_2^- em solução.

Baseando-se na constante K do equilíbrio de dissociação do HO_2 ($pK = 4,8$)^{21,24}, a constante de velocidade aparente da dismutação pode ser expressa como:

$$k' = k_{VIIa}[CH^+]/K^2 + k_{VIIb}[CH^+]/K + k_{VIIc} \quad (VIII)$$

ou acima de pH 7,0, quando $K \gg [H^+]$:

$$k' = k_{irb}[H^+]/K + k_{irc} \quad (IX)$$

A velocidade aparente de produção de MF em nossos ensaios fotoquímicos não variou significativamente entre pH 6,0 e 10,0 (Tabela IV). Como a velocidade de dismutação do O_2^- é dependente de pH (eq. 4 e 5), pode-se concluir que a redução do NBT pelo O_2^- é a reação dominante nesta faixa de pH.

Outras reações poderiam contribuir para o decaimento do O_2^- em solução e competir com a redução do NBT. Particularmente, a reação de O_2^- com H_2O_2 , catalizada por complexos de cobre e ferro (Mecanismo de Haber-Weiss), pode ser importante, mesmo em situações em que traços destes metais - contaminantes de componentes da mistura de reação - estejam presentes.

Analizando-se as possíveis vias de decaimento do O_2^- , é possível estabelecer os limites de aplicabilidade da detecção com o NBT. Assumindo-se um erro de 5%, nossa capacidade de medir O_2^- sem a interferência da dismutação espontânea ou das reações de oxi-redução catalizadas por complexos de ferro-EDTA depende do valor da seguinte razão entre velocidades:

$$V_{ir}/(V_{ir}+V_d) \gg 20 \quad (X)$$

onde V_{II} , V_V e V_{VI} são as velocidades das reações II, V e VI, respectivamente. Das equações I-VII e dos valores das constantes de velocidade acima descritos, é facilmente mostrado que a pH 7,0 a eq.X pode ser escrita como:

$$4,46 \times [NBT]/40 \times ([O_2^-] + [Fe]) > 20 \quad (XI)$$

Portanto, com uma concentração inicial de NBT igual a 0,2mM, é possível determinar, a pH 7,0, concentrações absolutas de O_2^- da ordem de 1uM, mesmo na presença de 0,5uM de ferro complexado com EDTA, sem interferência significativa de outras vias para o decaimento do O_2^- .

A eficiência da reação entre NBT e O_2^- assim considerada pode fornecer mais uma interpretação aos dados de Picker & Fridovich⁴⁴ sobre a geração de O_2^- pelo sistema NADPH/methosulfato de fenazina. O NBT é apontado como uma das substâncias responsáveis pela geração de O_2^- ⁴⁴. Como os nossos dados sugerem, o NBT pode ser reduzido por outras espécies que não o O_2^- , porém na presença de O_2 estas vias são desfavorecidas. Este fato é confirmado pela inibição significativa da redução do NBT (90%) quando SOD é adicionada ao meio de reação. No caso do Citocromo c, a redução direta do detetor pelo methosulfato de fenazina pode competir mais eficientemente com a redução por O_2^- que no

caso do NBT, não resultando uma inibição por SOD justamente porque neste caso a espécie envolvida na redução não é o O_2^- .

5.2 Efeito de interfaces

A presença de interfaces não interfere apreciavelmente com a geração e detecção de O_2^- em soluções aeradas, como pode ser deduzido pela equivalência das curvas padrão obtidas na presença e na ausência de micelas (Fig.6). Em soluções degaseadas as diferenças observadas no consumo de riboflavina (Tabelas I e II) sugerem que a presença de micelas pode favorecer a autoredução da riboflavina, talvez por concentrar esta substância na região da interface. Em soluções aeradas, a supressão pelo O_2 e a reação com o EDTA, que são as principais vias de decaimento do triplete não são afetadas pela presença de interfaces e não ocorre consumo apreciável de riboflavina nestas condições. Na presença de micelas, um esquema da geração acoplada à detecção de O_2^- , análogo ao Esquema II, resulta como segue:

A presença do sistema gerador completo em solução micelar (Esquema IIIA) implica na redução do NBT pelo O_2^- sem alteração na concentração da riboflavina. Na ausência de O_2 (Esquema IIIB), a riboflavina é reduzida pelo EDTA, mas não é reciclada porque o intermediário semirreduzido

Esquema III

reage com o NBT. Na ausência de EDTA em soluções micelares aeradas (Esquema IIIC), o triplete da riboflavina decai, como na ausência de micelas, principalmente pela supressão por O_2 , porém a auto-redução da riboflavina é favorecida, consumindo mais riboflavina e gerando maior quantidade do intermediário semirreduzido para a redução do O_2 . Na ausência de EDTA em soluções micelares degaseadas (Esquema IIID), o intermediário semirreduzido formado pela auto-redução da riboflavina reduz diretamente o NBT, consumindo a riboflavina.

As mudanças espectrais da MF, semelhantes às observadas na mudança de solvente (água-etanol), indicam que a MF é incorporada às micelas neutras. Dados de literatura mostram que a constante dielétrica na interface de micelas de Brij35 é semelhante à de etanol²². O aumento no rendimento de produto observado entre ensaios feitos nas mesmas condições, exceto pela presença ou ausência de micelas de Brij35 (Tabelas I e II), pode ser aparente, devendo-se à solubilização da MF na fase micelar que evita a precipitação do produto em soluções mais concentradas.

Os dados apresentados na Tabela III demonstram que a presença de interfaces pode, no máximo, dobrar a velocidade de reação. Outros autores

apresentam dados aparentemente conflitantes^{81,82,83}. Estes trabalhos mostram, entretanto, contradições entre dados obtidos utilizando diferentes fontes de O_2^- ^{81,82,83}; embora um aumento de 30% na velocidade da redução de NBT tenha sido observado à adição de KO_2 , fatores de aceleração máximos de 55 e 37 para a mesma reação foram observados quando o O_2^- foi gerado pela autooxidação de diferentes polifenóis, na presença de micelas de CTAB⁸³. Ainda no mesmo trabalho, micelas de Brij 35 aceleraram a reação por fatores de 5 e 7 vezes⁸³. Os mesmos autores mostraram uma aceleração da reação O_2^- /NBT de apenas 8 vezes por micelas de CTAB quando o sistema gerador de O_2^- é a autooxidação de hidroxilamina⁸². A redução do NBT por O_2^- nos sistemas estudados por estes autores não é inibida totalmente por SOD^{81,82}, sugerindo que a redução anaeróbica pode ser importante para outros geradores de O_2^- . Pode ocorrer que as micelas tenham efeito em favorecer a redução anaeróbica do NBT, estabilizando intermediários da autooxidação dos compostos testados. A análise dos dados apresentados na literatura^{81,82,83}, à partir dos valores de absorbância a 560nm, também não leva em consideração mudanças de coeficiente de extinção molar do produto formado devidas à incorporação nas

micelas (no caso da MF a mudança mínima ocorre a 530nm). Quando a velocidade inicial é empregada para o cálculo das constantes de velocidade da reação, ao invés do comportamento da função exponencial, pode conduzir a erro. Nos trabalhos em que se sugere a aceleração da redução do NBT por O_2^- em fase micelar, não é explicitado como foi feito o cálculo das constantes de velocidade. Não observamos, nem foram citadas na literatura, mudanças espectrais ou outras evidências que sugerissem a partição do NBT para a fase micelar. Este é, no entanto, um elemento fundamental do mecanismo proposto para a catálise da reação O_2^- /NBT por micelas^{81.82.83}. Ao contrário, as constantes de velocidade de reação por nós observadas para a redução do NBT em solução e na presença de micelas de Brij35 ou de CTACl tem valores muito próximos, sugerindo que o passo limitante da reação ou ocorre sempre na fase aquosa ou não sofre qualquer influência do ambiente. Em micelas de SDS o NBT associa-se ao detergente e não é reduzido a MF, provavelmente porque a reação com o O_2^- ocorre na fase aquosa. Preferimos admitir que o NBT permaneça na fase aquosa, em presença de CTACl, por ter duas cargas positivas e ser bastante solúvel em água. Outra evidência a favor desta hipótese é o fato de que o NBT não é capaz de

permeiar bicamadas positivas de HERQUAT, mesmo a temperaturas acima da transição de fase gel-cristal líquido (Tabela V).

5.3 Permeabilidade de bicamadas ao O_2^-

Quando o O_2^- foi obtido pela dissolução de KO_2 , somente a 45°C foram observadas mudanças na absorbância de uma suspensão de vesículas com NBT incluído (Tabela VI), demonstrando que, a esta temperatura, o O_2^- permeia a bicamada. A mudança na absorbância a 530nm, observada no ensaio de permeação a 45°C, tem a mesma magnitude daquela obtida quando ambos os reagentes, nas mesmas concentrações, encontram-se no compartimento externo de uma suspensão de vesículas (Tabela VI), demonstrando que o equilíbrio da concentração de O_2^- entre os dois compartimentos é suficientemente rápido para que a dismutação não seja mais importante que a permeação.

Da mesma forma, ensaios realizados com o sistema gerador de O_2^- por fotólise de riboflavina não revelam permeação apreciável a 25°C (Tabela V). Os controles deste ensaio demonstram claramente que o valor da constante de velocidade observado para a reação entre NBT e O_2^- em solução não varia com a presença de vesículas, desde que ambos os reagentes se encontrem no mesmo compartimento. A 45°C a própria riboflavina permeia a bicamada,

impossibilitando a análise cinética da permeação por este método. Mesmo o valor obtido para a constante de velocidade de formação da MF, no ensaio de permeabilidade a 25°C (Tabela V), pode estar sujeito a interferência da permeação lenta de riboflavina ou de seus produtos de degradação que tenham alguma atividade catalítica na geração de O_2^- . Esta última hipótese é favorecida pela semelhança observada entre as constantes de velocidade medidas para a permeação a 25°C e o controle em que a riboflavina foi incubada com as vesículas contendo NBT durante 1h a 25°C.

Como a constante de velocidade da reação entre O_2^- e NBT em solução não é muito diferente a 25°C e a 45°C (Tabela V), o efeito observado sobre a redução do NBT incluído nas vesículas pelo O_2^- gerado no compartimento externo, evidencia uma mudança na permeabilidade. Esta permeabilidade ao O_2^- parece depender das características físicas da bicamada. A 25°C a bicamada de HERQUAT está na fase gel e a 45°C, na fase cristal-líquido, mais fluida.

As células vivas têm a capacidade de manter nas suas membranas regiões mais ou menos fluidas, dependendo de uma série de fatores. Isto pode ser relevante na análise da toxicidade do O_2^- , se considerarmos que a concentração local desta espécie química pode ser o elemento decisivo no

estabelecimento de dano celular, seja diretamente ou via reação com peróxido de hidrogênio. Neste caso, a formação de $\text{OH}^\cdot$ por Reação de Fenton em sítios específicos pode depender da permeabilidade de membranas ao $\text{O}_2^\cdot$, uma vez que o H_2O_2 parece permear livremente a bicamada sem alterar suas propriedades²⁶.

Na verdade, mesmo a produção direcional de $\text{O}_2^\cdot$ pelo sistema NADPH-oxidase, na membrana dos granulócitos neutrófilos, sugere que a regulação da permeabilidade ao $\text{O}_2^\cdot$ pode ter algum papel na proteção da própria célula geradora ao dano bioquímico causado por espécies reativas do oxigênio.

6. CONCLUSÕES

Quanto à padronização da metodologia para geração e detecção do O_2^- , aplicável a sistemas contendo interfaces e à determinação da permeabilidade de membranas ao O_2^- , concluímos que:

- Um excesso de NBT na mistura de reação permite determinações quantitativas de O_2^- , por garantir uma via principal para o decaimento do O_2^- ;

- Concentrações mantidas de O_2^- , geradas por fotólise de riboflavina, bem como quantidades transientes, geradas por dissolução de KO_2 , podem ser convenientemente determinadas por NBT, demonstrando que este detetor pode ser de uso geral.

- A presença de micelas neutras e positivas não interfere apreciavelmente com os métodos de geração e detecção de O_2^- em solução.

No que se refere à permeabilidade de bicamadas lipídicas ao O_2^- , concluímos que:

- O O_2^- permeia rapidamente a membrana de vesículas de HERQUAT a 45°C e não permeia a membrana, ou o faz lentamente, a 25°C, temperaturas respectivamente acima e abaixo da temperatura de transição de fase gel/cristal-líquido do lipídio na bicamada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ALTMAN, F.P. & BUTCHER, R.G. - Studies on the reduction of tetrazolium salts. I. The isolation and characterization of a half formazan intermediate produced during the reduction of neotetrazolium chloride. Histochemie, Berlin, **37**: 333-350, 1973.
02. ALTMAN, F.P. - Studies on the reduction of tetrazolium salts. III. The products of chemical and enzymatic reduction. Histochemistry, Berlin, **38**: 155-171, 1974.
03. ASADA, K. & KANEMATSU, S. - Reactivity of thiols with superoxide radicals. Agar. Biol. Chem., Tokyo, **40**(9): 1891-1892, 1976.
04. ASHLEY, J.N.; DAVIS, B.N.; NINEHAM, A.W.; SLACK, R. - Tetrazolium compounds containing substituted phenyl and heterocyclic rings. J. Chem. Soc., London, 3881-3888, 1953.
05. BANGHAM, A.D.; STANDISH, M.M.; WATKINS, J.C. - Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. J. Mol. Biol., London, **13**: 253-259, 1965.
06. BEAUCHAMP, C. & FRIDOVICH, I. - Superoxide dismutase improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Anal. Biochem., Baltimore, **44**: 276-287, 1971.
07. BELLAVITE, P. - The superoxide-forming enzymatic system of phagocytes. Free Radical Biol. Med., New York, **4**: 225-261, 1988.

08. BIELSKI, B.H.J. & ALLEN, A.O. - Mechanism of the disproportionation of superoxide radicals. J. Phys. Chem., Washington, **81**: 1048-1050, 1977
09. BIELSKI, B.H.J.; SIUE, G.G.; BAJUK, S. - Reduction of nitro blue tetrazolium by CO_2^- and O_2^- radicals. J. Phys. Chem., Washington, **84**: 830-833, 1980
10. BIRNBOIM, H.C. & KANABUS-KAMINSKA, M. - The production of DNA strand breaks in human leukocytes by superoxide anion may involve a metabolic process. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Washington, **82**: 6820-6824, 1985.
11. BOWMANN, C.M.; BUTLER, E.N.; REPINE, J.E. - Hyperoxia damages cultured endothelial cells causing increased neutrophil adherence. Am. Rev. Respir. Dis., New York, **128**: 469-472, 1983.
12. BRAMHALL, J.; HOFMANN, J.; DeGUZMAN, R.; MONTESTRUQUE, S.; SCHELL, R. - Temperature dependence of membrane ion conductance analyzed by using the amphiphilic anion 5/6-carboxyfluorescein. Biochemistry, Washington, **26**: 6330-6340, 1987.
13. CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. - Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. Phys. Rev., New York, **59**(3): 527-605, 1979.
14. CHERONIS, N.D. & STEIN, H. - Tetrazolium salts as chemical reagents. J. Chem. Educ., Washington, **33**(3): 120-125, 1956.

15. CHIU, D.; LUBIN, B.; SHOET, S.B. - Peroxidative reactions in red cell biology. In: PRIOR, A.W., ed., Free radicals in biology. New York, Academic Press, 1982. v.5, p. 115-54.
16. CLASTER, S.; CHIU, D.T.Y.; QUINTANILHA, A.; LUBIN, B. - Neutrophils mediated lipid peroxidation in human red cells. Blood, New York, **64**(5): 1079-1084, 1984.
17. CUCCOVIA, I.M. - Reações químicas em interfaces, tiólise de ésteres de p-nitrofenila em micelas e lipossomos. Hidrólise de 2-feniliminotetrahidrofurano em micelas. São Paulo, 1980. [Tese de doutoramento - Instituto de Química da Universidade de São Paulo].
18. CZERLINSKI, G.H.; ANDERSON, B.; TOW, J.; REID, D.S. - Coupling of redox indicator dyes into an enzymatic reaction cycle. J. Biochem. Biophys. Methods, Amsterdam, **15**: 241-248, 1988.
19. DEAMER, D. & BANGHAM, A.D. - Large volume liposomes by an ether vaporization method. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, **443**: 629-34, 1976.
20. EDIE, M.J.; TYRER, J.H.; KUKUMS, J.R.; HOOPER, W.D. - Aspects of tetrazolium salts relevant to quantitative histochemistry. Histochemie, Berlin, **21**: 70-80, 1970.
21. FEE, J.A. & VALENTINE, J.S. - Chemical and physical properties of superoxide. In: MICHELSON, A.M.; MCCORD, J.M.; FRIDOVICH, I., eds. Superoxide and superoxide dismutases. London, Academic Press, 1977. p. 19-60.

22. FENDLER, J.H. & FENDLER, E.J. - Catalysis in micellar and macromolecular systems. New York, Academic Press, 1975. p. 48-53.
23. FENDLER, J.H. - Membrane mimetic chemistry: characterization and applications of micelles, microemulsions, monolayers, bilayers, vesicles, host-guest systems and polyions. New York, John Wiley/Interscience, 1982. p. 3; 113-183.
24. FLOHÉ, L. & OTTING, T. - Superoxide dismutase assays. Methods Enzymol., New York, 105(Oxygen Rad. in Biol. Systems): 95-97, 1984.
25. FOOTE, C.S. - Light, oxygen and toxicity. In: AUTOR, A.P.. Pathology of oxygen. Academic Press, London, 1982. p. 21-44.
26. FRIMER, A.A.; FORMAN, A.; BORG, D.C. - H_2O_2 diffusion through liposomes. Israel J. Chem., Jerusalem, 23: 442-445, 1983.
27. GALSTON, A.W. - Riboflavin retrospective or déjà-vu in blue. Photochem. Photobiol., Oxford, 25: 503-4, 1977.
28. GENNARO, R. & ROMEO, D. - The release of superoxide anion from granulocytes: effect of inhibitors of anion permeability. Biochem. Biophys. Res. Commun., New York, 88(1): 44-48, 1979.
29. GIBSON, Q.H. & HASTINGS, J.W. - The oxidation of reduced flavin mononucleotide by molecular oxygen. Biochem. J., London, 83: 368-377, 1962.

30. GOLDSTEIN, I.M. & WEISSMANN, G. - Effects of the generation of superoxide anion on permeability of liposomes. Biochem. Biophys. Res. Commun., New York, **75**(3): 604-609, 1977.
31. GOLDSTEIN, I.M.; KAPLAN, H.B.; EDELSON, H.S.; WEISSMANN, G. - Ceruloplasmin. A scavenger of superoxide anion radicals. J. Biol. Chem., Baltimore, **254**(10): 4040-4045, 1979.
32. GOLDSTEIN, S.; MICHEL, C.; BORS, W.; SARAN, M.; CZAPSKI, G. - A critical reevaluation of some assay methods for superoxide dismutase activity. Free Radical Biol. Med., New York, **4**: 295-303, 1988.
33. HABER, F. & WEISS, J. - The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. Proc. Royal Soc. Ser. A, London, **147**(861): 332-351, 1934.
34. HALLIWELL, B. & GUTERIDGE, J.M.C. - Free radicals in biology and medicine. New York, Oxford, 1986.
35. HALLIWELL, B. - Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates: is it a mechanism for hydroxyl radical production in biochemical systems?. FEBS Lett., Amsterdam, **92**(2): 321-326., 1978.
36. HAUSER, H.; PHILLIPS, M.C.; STUBBS, M. - Ion permeability of phospholipid bilayers. Nature, London, **239**: 342-344, 1972.

37. HEBBEL, R.P.; EATON, S.W.; STEINBERG, M.H. - Generation of activated oxygen by sickle erythrocytes: membrane bound hemichrome as a biological Fenton's reagent. Oxy. Rad. Their Scav. Syst., 2(Cellular and medical aspects): 53-59, 1983.
38. HEMMERICH, P.; KNOPPE, W.R.; KRAMER, H.E.A.; TRABER, R. - Distinction of $2e^-$ and $1e^-$ reduction modes of the flavin chromophore as studied by flash photolysis. Eur. J. Biochem., Berlin, 104: 511-520, 1980.
39. HOUSLAY, M.D. & STANLEY, K.K. - Dynamics of biological membranes: influence on synthesis, structure and function. Norwich, John Wiley, 1984. p. 17-38, 152-180.
40. JONES, G.R.N. - A rapid test of the purity of tetrazolium salts (bis-) on thin layer chromatograms. J. Chromatogr., Amsterdam, 32: 336-338, 1969.
41. KELLOGG, E.W. & FRIDOVICH, I. - Liposome oxidation and erythrocyte lysis by enzymically generated superoxide and hydrogen peroxide. J. Biol. Chem., Baltimore, 252(19): 6721-6728, 1977.
42. KIKUCHI, K. & KOIZUMI, M. - Photoreduction of proflavine in aqueous solution. I. A flash photolysis study. Bull. Chem. Soc. Japan, Tokyo, 40: 736-743, 1967.
43. KNOWLES, A. & MAUTNER, P.N. - The flavin sensitized photooxidation of nucleotides. III. The participation of oxygen. Photochem. Photobiol., Oxford, 15: 199-207, 1972.

44. KYLE, M.E.; NAKAE, D.; SAKAIDA, I.; MICCADEI, S.; FARBER, J.L.
- Endocytosis of superoxide dismutase is required in order for the enzyme to protect hepatocytes from the toxicity of hydrogen peroxide. J. Biol. Chem., Baltimore, 263(8): 3784-3789, 1988.
45. LASSER, N. & FEITELSON, J. - Excited state reactions of oxidated flavin derivatives. Photochem. Photobiol., Oxford, 21: 249-254, 1975.
46. LIEBER, M.R. & STECK, T.L. - A description of the holes in human erythrocyte membrane ghosts. J. Biol. Chem., Baltimore, 257(19): 11651-11659, 1982.
47. LIEBER, M.R. & STECK, T.L. - Dynamics of the holes in human erythrocyte membrane ghosts. J. Biol. Chem., Baltimore, 257(19): 11660-11666, 1982.
48. LYNCH, R.E. & FRIDOVICH, I. - Effects of superoxide on the erythrocyte membrane. J. Biol. Chem., Baltimore, 253(6): 1838-1845, 1978.
49. LYNCH, R.E. & FRIDOVICH, I. - Permeation of erythrocyte stroma by superoxide radical. J. Biol. Chem., Baltimore, 254(13): 4697-4699, 1978.
50. MARKLUND, S. - Spectrophotometric study of superoxide anion radicals and sensitive assay for superoxide dismutase. J. Biol. Chem., Baltimore, 261(23): 7504-7507, 1976.
51. MCCORD, J. & FRIDOVICH, I. - Superoxide dismutase. A enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). J. Biol. Chem., Baltimore, 244(22): 6049-6055, 1969.

52. McCORD, J. & FRIDOVICH, I. - Superoxide dismutases: a history. In: MICHELSON, A.M.; McCORD, J.M.; FRIDOVICH, I.; eds. Superoxide and superoxide dismutases. London, Academic Press, 1977. p. 1-10.
53. McCORD, J.; CRAPPO, J.D.; FRIDOVICH, I. - Superoxide dismutase assays. In: MICHELSON, A.M.; McCORD, J.M.; FRIDOVICH, I.; eds. Superoxide and superoxide dismutases. London, Academic Press, 1977. p. 11-18.
54. MELLO F^o, A.C. & MENECHINI, R. - Protection of mammalian cells by o-phenanthroline from lethal and DNA-damaging effects produced by active oxygen species. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, **842**:82-89, 1985.
55. MENECHINI, R. - A toxicidade do oxigênio. Ciênc. Hoje, São Paulo, **5**(28): 57-62, 1987.
56. MENECHINI, R. - Genotoxicity of active oxygen species in mammalian cells. Mutat. Res., Amsterdam, **195**: 215-230, 1988.
57. MICHELSON, A.M. - Chemical production of superoxide anions by reaction between riboflavin, oxygen, and reduced nicotinamide adenine dinucleotide. Specificity of tests for O_2^- . In: MICHELSON, A.M.; McCORD, J.M.; FRIDOVICH, I.; eds. Superoxide and superoxide dismutases. London, Academic Press, 1977. p. 87-106.

58. MISHIN,V.; POKROVSKY,A.; LYAKOVICH,V.V. - Interactions of some acceptors with superoxide anion radicals formed by the NADPH-specific flavoprotein in rat liver mitochondrial fractions. Biochem. J., London, **154**: 307-310, 1976.
59. MISRA,H.P. & FRIDOVICH,I. - The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. J.Biol.Chem., Baltimore, **247**(10): 3170-3175, 1972.
60. MOORE,M.; McDANIELS,J.C.; HEN,J.A. - The photochemistry of riboflavin. VI. The photophysical properties of isoalloxazines. Photochem.Photobiol., Oxford, **25**: 505-512, 1977.
61. MOORE,W.M. & IRETON,R.C. - The photochemistry of riboflavin. V. The photodegradation of isoalloxazines in alcoholic solvents. Photochem.Photobiol., Oxford, **25**: 347-356, 1977.
62. NIELSEN,K.L. - Methods in numerical analysis. New York, McMillan, 1968, p.308-311.
63. NINEHAM,A.W. - The chemistry of formazans and tetrazolium salts. Chem.Rev., Washington, **55**: 315-483, 1955.
64. PICKER,S.D. & FRIDOVICH,I. - On the mechanism of production of superoxide radical by reaction mixtures containing NADH, phenazine methosulphate and nitroblue tetrazolium. Arch.Biochem.Biophys., New York, **228**(1): 155-158, 1984.

65. PRYOR, W.A. - Why is the hydroxyl radical the only radical that commonly adds to DNA? Hypothesis: it has a rare combination of high electrophilicity, high thermochemical reactivity and a mode of production that occur near DNA. Free Radical Biol. Med., New York, **4**: 219-223, 1988.
66. RACHMILEWITZ, E.A. & THORELL, B. - Hemichromes in single inclusion bodies in red cells of beta thalassemia. Blood, New York, **39**(6): 794-800, 1972.
67. RADDA, G.K. & CALVIN, M. - Chemical and photochemical reductions of flavin nucleotides and analogs. Biochemistry, Washington, **3**(3): 384-393, 1964.
68. RICE-EVANS, I.C. & HOLCHSTEIN, P. - Alterations in the erythrocyte membrane fluidity by phenylhydrazine-induced peroxidation of lipids. Biochem. Biophys. Res. Commun., New York, **100**(4): 1537-1542, 1981.
69. ROOT, R.K. & METCALF, J.A. - H_2O_2 release from human granulocytes during phagocytosis: relationship of superoxide formation and cellular catabolism of H_2O_2 ; studies with normal and cytochalasin treated cells. J. Clin. Invest., New York, **60**: 1266-1279, 1979.

70. ROTILIO,G.; FIORETTI,E.; FALCIONI,G.; BRUNORI,M. -
Generation of superoxide radical by heme proteins and
its biological relevance. In: MICHELSON,A.M.;
McCord,J.M.; FRIDOVICH,I.; eds. Superoxide and
superoxide dismutases. London, Academic Press, 1977.
p. 239-244.
71. RUBANYI,G.M. - Vascular effects of oxygen-derived free
radicals. Free Radical Biol.Med., New York, 4: 107-
120, 1988.
72. RUMYANTSEVA,G.V.; WEINER,I.M.;MOLLIN,Y.N.; BUDNER,V.G. -
Permeation of liposome membrane by superoxide radical.
FEBS Lett., Amsterdam, 108(2): 477-480., 1979.
73. SADLER,K.L. & BADWEY,J.A. - Second messenger involved in
superoxide production by neutrophils.
Hematol.Oncol.Clin. North Am., Philadelphia, 2(2):
185-199, 1988.
74. SAWYER,D.T. & VALENTINE,J.S. - How super is superoxide?
Acc.Chem.Res., Washington, 14: 393-400, 1981.
75. SHAKLAI,N.; SHVIRO,Y.; RAABIZADEH,J.; KUCHENER-ZILBER,I.
- Accumulation and drainage of hemin in the red cell
membrane. Biochim.Biophys.Acta, Amsterdam, 821: 355-
366, 1985.
76. SINGLETON,W.S.; GRAY,M.S.;BROWN,M.L.; WHITE,J.L. -
Chromatographically homogeneous lecithin from egg
phospholipids. J.Am.Oil Chemist's Soc., Champaign, 42:
53-56, 1965.

77. SMITH,E.L.; HILL,R.L.; LEHMAN,I.R.; LEFKOWITZ,R.J.;
HANDLER,P.; WHITE,A. - Bioquimica: mamiferos, 7ed.,
Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1985. p.71-72.
78. STELMO,M.; CHAIMOVICH,H.; CUCCOVIA,I.M. - Quantitative
determination of alkylammonium amphiphiles using
neutral detergents. J.Colloid Interface Sci., New
York, 112(1): 200-204, 1987.
79. SZEKENI,J. & TOTI,K. - Lipid peroxidation in hemoglobin-
containing liposomes. Effects of membrane phospholipid
composition and cholesterol content. Biochim.Biophys.
Acta, Amsterdam, 852: 139-145, 1986.
80. SZOKA,F.Jr & PAPAHAIOPOULOS,D. - Procedure for
preparation of liposomes with large internal aqueous
space and high capture by reverse phase evaporation.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, Washington, 75: 4194-4198,
1978.
81. TAKABE,T.; ISHIKAWA,H.; MIYAKAWA,M.; NIKAI,S. - Effects
of Cu^{2+} , EDTA and detergents on the autoxidation of
dithiothreitol. Agric.Biol.Chem., Tokyo, 42(3): 593-
598, 1978.
82. TAKABE,T.; MIYAKAWA,M.; NIKAI,S. - Effects of Cu^{2+} and
detergents on the autoxidation of hydroxylamine
involving superoxide anion radicals. Agric.Biol.Chem.,
Tokyo, 43(3): 613-616, 1979.

83. TAKABE, T.; MIYAKAWA, M.; NIKAI, S. - The micellar acceleration of the reduction of nitroblue tetrazolium by superoxide anion radicals during the autoxidation of polyphenols. Bull. Chem. Soc. Japan, Tokyo, **51**(1): 321-322, 1978.
84. TAKAHASHI, M. & ASADA, K. - Superoxide anion permeability of phospholipid membranes and chloroplast tylakoids. Arch. Biochem. Biophys., New York, **224**(2): 558-566, 1983.
85. TSOU, K.C.; CHENG, C.S.; NACHLAS, M.M.; SELIGMAN, A.M. - Syntheses of some p-nitrophenyl substituted tetrazolium salts as electron acceptors for the demonstration of dehydrogenases. J. Am. Chem. Soc., Washington, **78**: 6139-6144, 1956.
86. VANDERPAS, J. & VERTONGEN, F. - Erythrocyte vitamin E is oxidized at lower peroxide concentration in neonates than in adults. Blood, New York, **66**(6): 1272-1277, 1985.
87. VANGELDER, B.F. & SLATER, E. - The extinction coefficient of cytochrome c. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, **58**: 593-595, 1962.
88. WALLACE, W.J. & CAUGHEY, W.S. - Mechanism for the autoxidation of hemoglobin by phenols, nitrite and "oxidant" drugs. Peroxide formation by one electron donation to bound dioxygen. Biochem. Biophys. Res. Commun., New York, **62**(3): 561-567, 1975.

89. WEVER, R.; OUDEGA, B.; VANGELDER, B.F. - Generation of superoxide radicals during the autoxidation of mammalian oxyhemoglobin. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, 302: 475-478, 1973.
90. WOOD, P.M. - The two redox potentials for oxygen reduction to superoxide. Trends Biochem. Sci., Amsterdam, 12: 250-251, 1987.