



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ESTADO DA ARTE DOS MÉTODOS, IN VITRO E IN VIVO, DE
DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA**

Trabalho submetido por
Margarida Augusta da Silva Palla Garcia
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Doutora Zilda Morais

Outubro de 2014

Dedico este trabalho final à minha avó, país e irmão que sempre me ajudaram e me apoiaram nos bons e maus momentos e a quem desejo tudo de bom.

Agradeço toda a ajuda e paciência que a Professora Zilda Morais demonstrou ter para
comigo. O meu muito obrigado.

RESUMO

Este trabalho teve como objectivo realizar um estudo sobre o estado da arte dos métodos de determinação da actividade hemolítica *in vivo* e *in vitro*. Nesse sentido, realizou-se uma revisão bibliográfica sobre esta matéria, no período de Janeiro de 2010 a Maio de 2014, tendo-se encontrado 36 artigos pertinentes.

Quanto à natureza do eritrócito-alvo, em 50% dos artigos analisados utilizaram-se eritrócitos humanos; nas restantes publicações investigaram-se maioritariamente eritrócitos de mamíferos, sobretudo de ovelha e coelho. Além de mamíferos, também os eritrócitos de aves, galinhas, foram estudados, em 5 artigos.

Em relação ao agente hemolítico, encontraram-se estudos focalizados na acção de microorganismos, de organismos marinhos e terrestres e ainda de compostos sintéticos, sendo que estes últimos representaram 1/3 do total.

De modo a caracterizar a diversidade do modo de acção hemolítica, foram examinados com maior detalhe os agentes hemolíticos *Candida albicans*, fulereno e fenil-hidrazina, bem como a hemoglobina - o principal factor de detecção da actividade hemolítica.

Nos 36 artigos estudados, encontraram-se métodos com diferentes graus de aplicabilidade e custo, nomeadamente a detecção visual de actividade hemolítica *in vivo*, a detecção visual da actividade hemorrágica, a medição dos halos de hemólise, a medição dos halos hemorrágicos, a espectrofotometria de absorção, a microscopia de força atómica e a citometria de fluxo. Os métodos referidos apresentaram-se em ordem crescente de complexidade de execução.

De entre as publicações analisadas, 86% adoptaram o método de espectrofotometria de absorção na gama do visível. Esta prevalência deveu-se à sua versatilidade em termos de amostra analisável e à sua boa sensibilidade, além de permitir uma análise quantitativa rápida e a baixo custo.

PALAVRAS-CHAVE: Actividade hemolítica; métodos determinação actividade hemolítica; hemólise; hemoglobina.

ABSTRACT

In vivo and *in vitro* hemolytic activity determination method state of the art was the objective of this study. For this reason, a bibliographic review was made concerning the hemolytic activity determination method in published articles, since 2010 until May 2014, having the final

In relation to the erythrocytes in analyses, in 50% of the articles were used human erythrocytes; in the other publications the mammals erythrocytes were the majority to be investigated, in particular the sheep and rabbit. Birds erythrocytes, chicken, were studied in 5 articles.

In relation to the hemolytic agent, focalized studies in the action of microorganism, marine organism, land and synthetic compounds were found, the last one represent 1/3 of the total.

Attending to the hemolytic activity diversity, *Candida albicans*, fullerene and fenilhydrazine were studied in detail, as well, as the hemoglobin – the principal factor of hemolytic activity detection.

In the 36 articles studied, different methods were found with variable applicability degrees and costs, namely, *in vivo* hemolytic activity visual detection, hemorrhagic activity visual detection, hemolysis halos measurement, hemorrhagic halos measurement, absorption spectrophotometry, atomic force microscopy and flow cytometry. Such methods indicated herein are in order of increasing execution complexity.

Among the studied articles, 86% used the absorption spectrophotometry method. This prevalence exists due to its versatility in terms of sample that can be analyze, its sensibility beyond a rapid and quantitative analyses that can be performed at low cost.

Key words: hemolytic activity; hemolytic activity determination method; hemolysis; hemoglobin.

ÍNDICE

Dedicatória	3
Agradecimentos	5
Resumo	7
<i>Abstract</i>	8
Índice	9
Índice de Figuras	10
Índice de Tabelas	12
Lista de Acrónimos	13
1. Introdução	15
1.1 Objectivo e Metodologia	15
1.2 Caracterização da Actividade Hemolítica	15
1.2.1 Eritrócito	15
1.2.2 Membrana do Eritrócito	17
1.2.3 Grupos Sanguíneos dos Eritrócitos Humanos	19
1.2.4 Análise das Semelhanças entre o Eritrócito Humano e de Outros Animais	21
1.3 Hemoglobina	22
1.4 Agentes Causadores da Hemólise	27
2. Métodos de Determinação da Actividade Hemolítica	41
2.1 Detecção Visual de Actividade Hemolítica <i>In Vivo</i>	43
2.2 Detecção Visual de Actividade Hemolítica <i>In Vitro</i>	45
2.3 Medição dos Halos de Hemólise <i>In Vitro</i>	46
2.4 Medição dos Halos Hemorrágicos <i>In Vivo</i>	48
2.5 Espectrofotometria de Absorção	50
2.6 Microscopia Força Atómica	54
2.7 Citometria de Fluxo	58
3 Análise Comparativa dos Métodos	62
4 Bibliografia	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Eritrócito e produtos heme (adaptado de Sigma-Aldrich, 2014)	16
Figura 2: Várias etapas da eritropoiese (Pearson Education, 2004)	17
Figura 3: Membrana no eritrócito (adaptado de Rice University, 2012)	18
Figura 4: Formas do eritrócito a) Secção transversal da forma quiescente b) Vista superior da forma quiescente c) Forma sob restrição moderada d) Forma sob forte constrangimento fisiológico (adaptado de GSI – Materials Research, 2014)	19
Figura 5: Tipos sanguíneos e seu aglutinogênio (adaptado de Adam, 2009)	20
Figura 6: Estrutura da hemoglobina a) Estrutura molecular da hemoglobina b) Estrutura química do heme (Saladin, 2012)	23
Figura 7: Reacção redução oxidação da hemoglobina (Schaller, 2014)	24
Figura 8: Comportamento da hemoglobina na presença de oxigénio (adaptado de Hudnall, 2012)	25
Figura 9: Comparação do espectro de absorção da hemoglobina e oxihemoglobina (adaptado de Oregon Medical Laser Center, 2014)	26
Figura 10: O efeito sobre o eritrócito de pressão osmótica (adaptado de AboutEducation, 2014)	29
Figura 11: Imagem de escorpião (<i>Maurus</i>) (Ciência Hoje, 2014)	30
Figura 12: Imagem de serpente (<i>Crotalus</i>) e de fórmula química da fosfolipase 2 (Ibc Bioquímica, 2014)	32
Figura 13: Percentagem de hemólise de acordo com o tempo 0 de incubação (adaptado de Watanabe <i>et al</i> , 1999)	33
Figura 14: a) Proteína <i>versus</i> açúcar b) Percentagem de hemólise <i>versus</i> reactividade (adaptado de Watanabe <i>et al</i> , 1999)	34
Figura 15: Estrutura da Csa2 (Lintner <i>et al</i> , 2011)	36
Figura 16: Estrutura química da fulereno (EncyclopediaBritannica, 2014)	37
Figura 17: Hemólise provocada por $nC_{60}THF$, $nC_{60}CDX$ e $nC_{60}EVA-EVV$ (adaptado de Trpkovic, 2010)	38
Figura 18: Estrutura química da fenil-hidrazina (WHO, 2000)	39
Figura 19: Reacção da fenil-hidrazina com a hemoglobina (Shetlar & Hill, 1985)	40
Figura 20: a) Superfície interna da pele do <i>M. musculus</i> com 5,0 µg de veneno liofilizado de serpente (<i>Alsophis portoricensis</i>) b) 5,0 µg e 10,0 µg da metalprotease <i>alsophine</i> (adaptado de Weldon & MacKessy, 2012)	44

Figura 21: Nunc™ Edge 96-Well Plate (Thermo Scientific, 2014)	45
Figura 22: Fotografia representativa da hemólise provocada por diversas espécies de <i>Candida</i> no agar com sangue de ovelha (adaptado de Lou <i>et al</i> , 2001)	47
Figura 23: Efeito da dose hemorrágica de veneno de <i>C. atrox</i> em ovos de galinha fertilizados A) 20 µg de veneno B) 20 µg de veneno tratado com 0,7 mA C) Controlo (adaptado de Calzia <i>et al</i> , 2011)	49
Figura 24: Esquema teórico da espectrofotometria de absorção (adaptado de UCDavis Chemwiki, 2014)	51
Figura 25: Esquema representativo da interação dos diversos componentes do sangue e as nanopartículas de sílica. (adaptado de Yildirim <i>et al</i> , 2013)	52
Figura 26: Curva padrão da saponina (De-Qiang <i>et al.</i> , 2011)	54
Figura 27: Representação do fulereno-THF através de microscopia de força atómica (Trpkovic <i>et al</i> , 2010)	55
Figura 28: Princípio de funcionamento do sensor de sinal gerado pela microscopia de força atómica (adaptado de Ambios Technology Corporation, 2007)	55
Figura 29: Microscópio de força atómica (Nuance, 2014)	56
Figura 30: Eritrócitos incubados com 1 µg mL ⁻¹ nC ₆₀ THF durante 0 min, 30 min e 60 min (Trpkovic <i>et al</i> , 2010)	57
figura 31: Rugosidade do eritrócito aos 0 min, 30 min e 60 min (Trpkovic <i>et al</i> , 2010).	58
Figura 32: Feixes da citometria de fluxo que incidem sobre o fluxo de células (BD Biosciences, 2009)	59
Figura 33: Marcação das células em citometria de fluxo (adaptado BD Biosciences, 2009)	60
Figura 34: Citometria de fluxo eritrócitos de teste controle e nC ₆₀ THF passado 1h de incubação (adaptado de Trpkovic <i>et al</i> , 2010)	61
Figura 35: Esquema com os agentes hemolíticos estudados (dados da Tabela 6)	64
Figura 36: Número de ensaios realizados consoante o tipo de eritrócito (dados da Tabela 7)	66

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Grupos sanguíneos (adaptado de Adam, 2009)	21
Tabela 2: Características de alguns eritrócitos de animais (adaptado de Reagan, Sanders, & Denicofa, 1999; Poljičak-Milas, Kardum-Skelin, Vuđan, Marenjak, Ballarin-Perharić & Milas, 2009)	22
Tabela 3: Intervalos de referência para a hemoglobina (adaptado de Rodak et al, 2012)	24
Tabela 4: Utilização da fenil-hidrazin na Europa Ocidental (adaptado WHO, 2000)	39
Tabela 5: Resumo dos métodos de determinação da actividade hemolítica do estudo realizado	42
Tabela 6 Tipos de agentes hemolíticos do estudo realizado	62
Tabela 7 Resumo dos tipos de eritrócitos do estudo realizado	65

LISTA DE ACRÓNIMOS

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

HD₅₀ - o valor de metade da dose que iria provocar a lise de um determinado volume de eritrócitos

nC_{60THF} - Fulveno com tetra-hidrofurano

PO₂ – Pressão Oxigénio

THF – Tetra-hidrofurano

1. INTRODUÇÃO

1.1 Objectivo e Metodologia

Este trabalho teve como objectivo realizar um estudo sobre o estado da arte dos métodos de determinação da actividade hemolítica *in vivo* e *in vitro*, em Maio de 2014. Para isso utilizaram-se os motores de busca Google Académico e Biblioteca do Conhecimento Online (b-on).

Em relação às palavras-chave, para realizar a pesquisa introduziram-se os termos *hemolytic activity method*, *hemolytic activity determination*, *hemolytic activity detection*, método actividade hemolítica e determinação actividade hemolítica. Os artigos seleccionados foram os mais recentes, a partir de 2010, e que se encontravam acessíveis em um dos sítios electrónicos referidos.

Para a apresentação do trabalho, optou-se por descrever inicialmente as principais características dos intervenientes relacionados com a actividade hemolítica, nomeadamente o eritrócito e os agentes hemolíticos. Na etapa seguinte, adoptou-se referir, resumidamente, o princípio físico-químico de cada método encontrado na pesquisa, seguido do respectivo procedimento de determinação da actividade hemolítica. Por fim, agruparam-se os métodos, segundo vários parâmetros, e compararam-se as suas propriedades. Em concreto, esse exame teve como critérios de avaliação a aplicabilidade do método, o tempo de execução, a sensibilidade, as amostras utilizadas e os constrangimentos económicos.

1.2 Caracterização da Actividade Hemolítica

1.2.1 Eritrócito

O eritrócito tem como função principal distribuir oxigénio pelo organismo, mas também auxiliar no transporte de dióxido de carbono e no controlo do pH sanguíneo, permanecendo activo durante cerca de 120 dias (Lichtman, Kipps, Seligsohn, Kaushansky & Parchal, 2010).

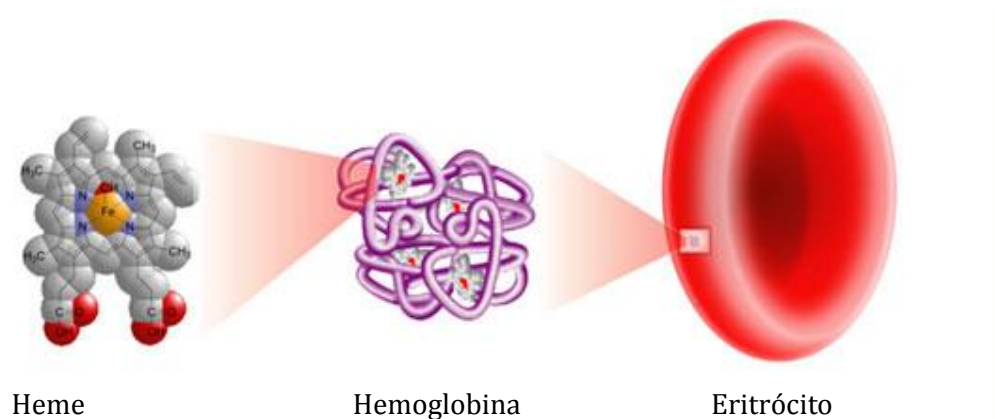


Figura 1: Eritrócito e produtos heme (adaptado de Sigma-Aldrich, 2014)

Estas células são anucleadas, têm a forma de um disco bicôncavo medindo cerca de 7 a 8 μm de diâmetro e espessura entre os 1,5 e os 2,5 μm , bem como um excesso de membrana plasmática em relação ao conteúdo celular (Rodak, Fritsma & Keohane, 2012).

A membrana em excesso permite ao eritrócito alterar a sua forma, na passagem pelos capilares, sem sofrer distensão ou ruptura. A sua forma bicôncava favorece a existência de uma grande superfície de difusão, em relação ao seu tamanho e volume (Rodak *et al*, 2012).

O citoplasma é constituído em cerca de 90% por hemoglobina, o que representa um valor próximo de 270.000.000 de moléculas de hemoglobina (Sigma-Aldrich, 2014).

O citoplasma contém também uma enzima, anidrase carbónica, que catalisa a reacção reversível do dióxido de carbono: $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3$.

A molécula da hemoglobina, que será abordada com maior detalhe no tópico 1.3, é uma proteína globular conjugada constituída por 4 grupos heme e 2 pares de cadeias polipeptídicas heterogéneas (α e β) (Saladin, 2012), como se pode observar na figura 1.

Os eritrócitos ou hemácias são as células mais numerosas do sangue e fazem parte da linhagem mielóide do sistema hematopoiético, assim como os neutrófilos, eosinófilos,

basófilos, monócitos, megacariócitos e mastócitos (Hoffbrand & Moss, 2011). Os valores de referência para o sangue humano considerado normal são de $4-8 \times 10^6$ eritrócitos por mL (Sigma-Aldrich, 2014).

Cerca de 2 milhões de novas células são formadas em cada minuto na medula óssea (Sigma-Aldrich, 2014). Os eritrócitos experimentam profundas alterações no decorrer do seu desenvolvimento, sendo a mais expressiva a extrusão do núcleo como pode-se observar na figura 2.

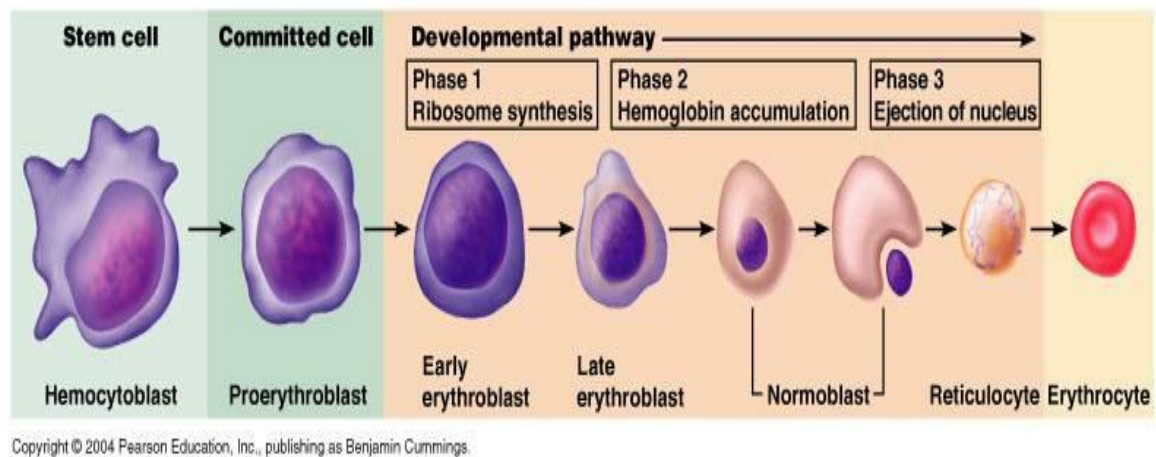


Figura 2: Várias etapas da eritropoiese (Pearson Education, 2004).

O facto de não possuírem núcleo nem outros organelos impossibilita a síntese de ácidos nucleicos ou proteínas. A perda da mitocôndria durante a maturação elimina a respiração celular e a capacidade de realizar o ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa, impossibilitando assim a síntese de um novo grupo heme ou lípidos.

Devido à sua função, deve ter uma membrana flexível e deformável, para que este consiga penetrar e permanecer na circulação sanguínea (Hoffbrand & Moss, 2011), o que será abordado de uma forma mais detalhada no tópico seguinte.

1.2.2 Membrana do Eritrócito

A membrana é essencialmente constituída por uma bicamada lipídica, uma rede de citoesqueleto e proteínas transmembranares, sendo as mais importantes a glicoforina, a

banda 3 e glicoproteínas, como se pode observar na figura 3. O citoesqueleto é uma rede hexagonal de moléculas poliméricas de espectrina, a actina, a anquirina, banda ou proteína 4.1, paladin e a proteína banda 4.9, entre outras. A complexa interacção entre as proteínas da membrana e do citoesqueleto permite oferecer ao eritrócito a deformabilidade que este necessita para conseguir fluir na corrente sanguínea e passar através de pequenos capilares com dimensões menores que o diâmetro do próprio eritrócito (Knowles Lab, 2012).

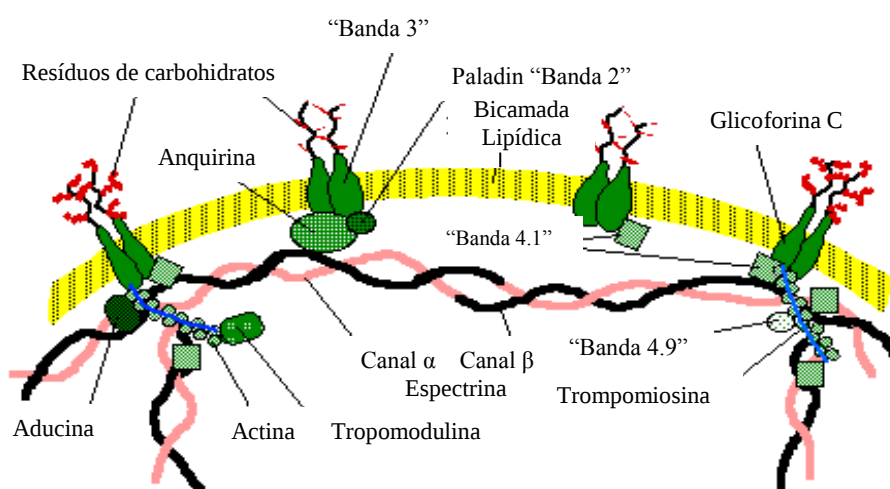


Figura 3: Membrana no eritrócito (adaptado de Rice University, 2012)

O glóbulo vermelho tem a necessidade de adaptar a sua forma às forças de corte existentes no fluxo no qual se encontra imerso. Uma vez que o eritrócito tem um diâmetro de aproximadamente 7 a 8 μm e nalguns casos têm a necessidade de penetrar em capilares com um diâmetro inferior, a deformabilidade é muito importante porque permite que a sua forma seja adaptada, podendo passar a ter um diâmetro de 3 μm , como se pode observar na figura 4. Esta faculdade vai evitar que os eritrócitos fiquem presos nos capilares, evitando assim que seja bloqueado o fluxo sanguíneo (GSI – Materials Research, 2014).

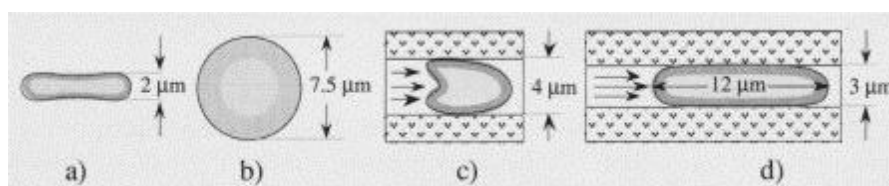


Figura 4: Formas do eritrócito **a)** Secção transversal da forma quiescente **b)** Vista superior da forma quiescente **c)** Forma sob restrição moderada **d)** Forma sob forte constrangimento fisiológico (adaptado de GSI – Materials Research, 2014)

A deformabilidade do eritrócito depende fundamentalmente de 3 factores, sendo eles: o rácio entre a superfície e o volume da célula, a rigidez da membrana celular, e a viscosidade do plasma dos glóbulos vermelhos (GSI – Materials Research, 2014).

Adicionalmente, a deformabilidade do eritrócito está relacionada com a proteína “banda 3” que está inserida na bicamada lipídica da membrana, mantendo uma ligação com as proteínas periféricas, em particular com a anquirina, que está associada à espectrina (Hoffbrand & Moss, 2011).

Uma proteína que regula a forma da célula é a glicoforina C, presente na figura 3, com especial ligação à proteína “banda 4.1”, dando-lhe a estabilidade e deformabilidade que a membrana necessita para desempenhar as funções (Chasis & Mohandas, 1992). A glicoforina é a responsável por cerca de 60% da carga negativa da superfície do eritrócito, devido ao elevado peso do ácido siálico que se encontra presente na mesma. Por este motivo, desempenha um papel importante na interacção entre eritrócitos ou com o endotélio vascular (Knowles Lab, 2012).

1.2.3 Grupos Sanguíneos dos Eritrócitos Humanos

Em 3 estudos analisados sobre a actividade hemolítica, foram utilizadas diferentes amostras de eritrócitos humanos de grupos sanguíneos de acordo com o sistema AB0, motivo pelo qual este tema foi abordado.

No sistema AB0 existem diferentes grupos sanguíneos, sendo eles o A, B, AB e grupo 0. Os diferentes tipos de sangue têm uma estrutura química muito similar. O que os diferencia, no caso do tipo A, é a presença de uma cadeia de N-acetilgalactosamina, enquanto no tipo B tem a galactose em sua alternativa. Em relação ao tipo 0, não tem nem uma nem outra na sua extremidade.

A maior parte dos antígenos são componentes integrais da membrana, compostos por hidratos de carbono complexos associados a proteínas ou lipídeos inseridos na membrana eritrocitária sendo denominados por glicoproteínas ou glicolipídeos respectivamente (Hoffman, Benz, Silberstein, Heslop, Weitz & Anastasi, 2013).

À superfície dos eritrócitos humanos podem existir dois tipos de proteínas: o aglutinogénio A e o aglutinogénio B, de acordo com a sua presença ou ausência, os grupos são classificados como se pode observar na figura 5.

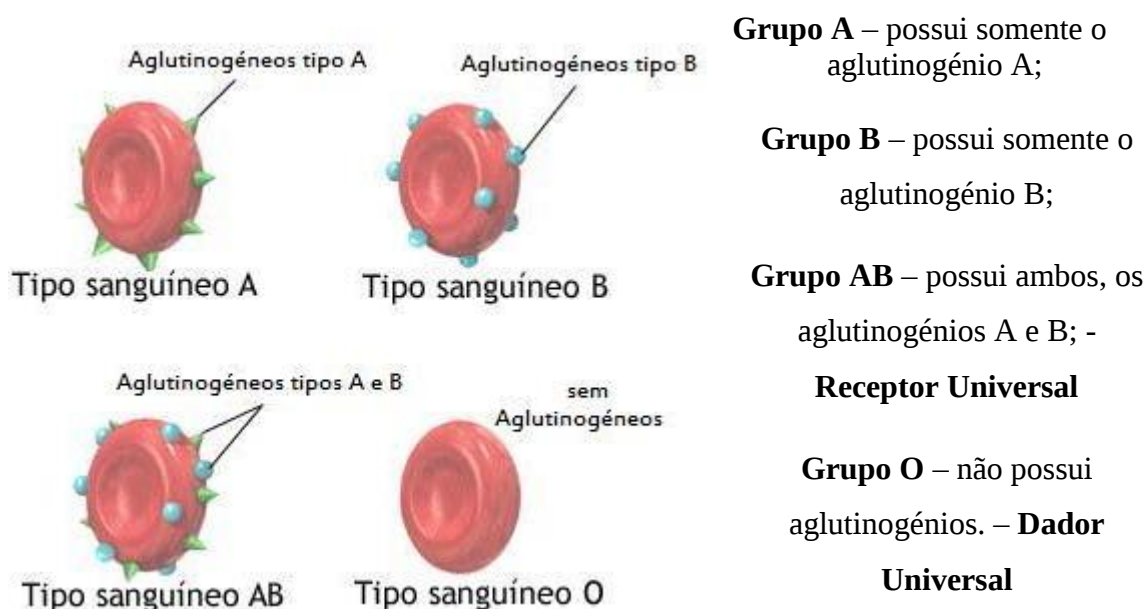


Figura 5: Tipos sanguíneos e seu aglutinogénio (adaptado de Adam, 2009)

Se uma pessoa for do grupo AB, possui aglutinogénios AB, não podendo ter anticorpos contra esses antígenos, ou seja, não tem aglutinina anti-A nem anti-B como se encontra resumido na tabela 1, sendo por isso um “receptor universal de sangue”.

Tabela 1 Grupos sanguíneos (adaptado de Adam, 2009)

Grupo Sanguíneo	Aglutinogénio	Aglutina
A	A	Anti-B
B	B	Anti-A
AB	A e B	Não possui
0	Não possui	Anti-A e Anti-B

Da mesma forma, uma pessoa do grupo 0 não tem aglutinogénios e por isso produz aglutininas, anti-A e anti-B, podendo apenas receber sangue do seu próprio grupo sanguíneo, mas uma vez que não tem aglutinogénios pode dar a qualquer pessoa de qualquer grupo, é o dador universal. Caso contrário, ocorrem reacções que provocam a aglutinação ou o agrupamento de eritrócitos, levando a trombozes e comprometimento da circulação do sangue no organismo (Lichtman *et al*, 2010).

1.2.4 Análise das Semelhanças entre o Eritrócito Humano e de Outros Animais

Dados os problemas que a actividade hemolítica causa nos seres humanos, existia a necessidade de testar por exemplo um novo medicamento, a actividade de uma bactéria ou de um animal ou de uma planta de uma maneira que não causasse dano às pessoas.

Por esse motivo, a actividade hemolítica era testada *in vitro*. Nestes casos, nos artigos estudados foram utilizados eritrócitos humanos (indiferenciados ou tipo A, B, AB ou 0) como será possível comprovar na análise que é realizada no tópico 3. Nesse exame foi também tipificada a utilização de eritrócitos de animais que eram usados, sendo os mais comuns os de coelho e ovelha.

Nesse sentido, seria interessante perceber as semelhanças entre os eritrócitos humanos e dos animais utilizados nos estudos. A tabela 2 mostra algumas características dos eritrócitos de alguns animais.

Tabela 2 Características de alguns eritrócitos de animais (adaptado de Reagan, Sanders, & Denicofa, 1999; Poljičak-Milas, Kardum-Skelin, Vuđan, Marenjak, Ballarin-Perharić & Milas, 2009)

Animal	Diâmetro (µm)	Palidez Central
Cão	7,0	++
Gato	5,8	+
Cavalo	5,7	+/-
Coelho	6,33	+
Gado	5,5	+
Ovelha	4,5	+
Rato	6	+
Cabra	3,2	+/-

Em termos de diâmetro, como se pode confirmar na tabela 2, os eritrócitos mais próximos do humano são o do cão, coelho e rato. Todos eles apresentam um valor para o diâmetro igual ou superior a 6µm e inferior a 7 µm, enquanto o humano apresenta um valor próximo dos 8 µm. Estes glóbulos vermelhos apresentam também uma elevada palidez central (Reagan, 1999).

A hemácia do gato, cavalo e vaca são bicôncavas e apresentam um diâmetro muito próximo e a parte central não é muito clara, bem como a palidez central é maior no caso da hemácia no caso do felino e ruminante (Reagan, 1999).

1.3 Hemoglobina

A hemoglobina (Hb) é uma proteína que constitui o principal componente dos eritrócitos, sendo a libertação da mesma, um dos indicadores mais utilizados para realizar a detenção da actividade hemolítica, motivo pelo qual será de seguida apresentada com maior detalhe. A hemoglobina é solúvel na água e formada pela união de uma proteína incolor: a *globina*, que por sua vez é constituída por dois pares de cadeias de aminoácidos, α e β e de um composto corado que possui quatro grupos, os quais contêm ferro e são chamados de grupo *heme* como se pode ver na figura 6 a) (Saladin, 2012).

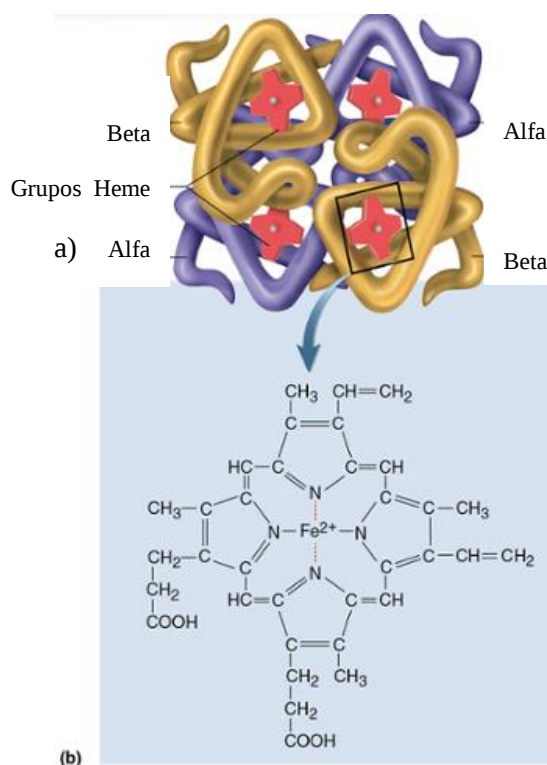


Figura 6: Estrutura da hemoglobina a) Estrutura molecular da hemoglobina b) Estrutura química do heme (Saladin, 2012)

Como se pode ver na figura 6 b), a estrutura química da hemoglobina é constituída por ferro (Fe^{2+}), no centro do grupo heme, que pode ter uma ligação com seis elementos, quatro dos quais são o azoto e os outros são o oxigénio e a histidina, como se pode observar na figura 6.

Ao se verificar a ligação com o oxigénio, a hemoglobina vai passar a adoptar um complexo octaédrico, passando a ser oxi-hemoglobina. Neste estado, pode ocorrer uma reacção de redução-oxidação, onde o ferro sofre uma oxidação passando de Fe^{2+} para Fe^{3+} e o oxigénio sofre uma redução, como se pode ver na figura 7 (Schaller, 2014).

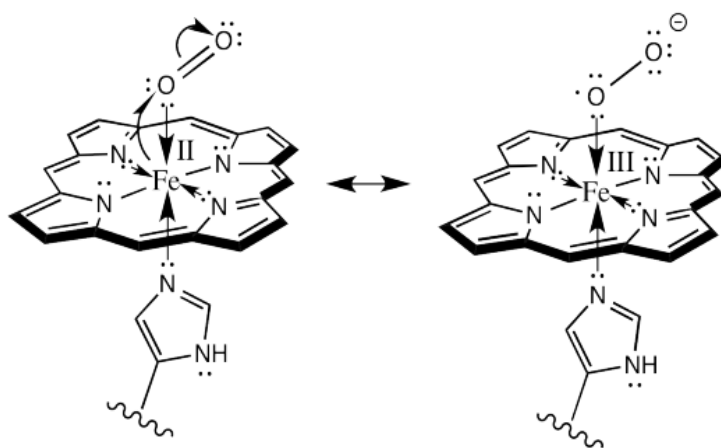


Figura 7: Reacção redução oxidação da hemoglobina (Schaller, 2014)

Os intervalos de referência para hemoglobina variam de acordo com o género e fase da vida, como pode ser visualizado na tabela 3.

Tabela 3: Intervalos de referência para a hemoglobina (adaptado de Rodak et al, 2012)

Género	Intervalos de Referência
Homem	140 a 180 g/L
Mulher	120 a 150 g/L
Recém-Nascido	165 a 215 g/L

A afinidade da Hb pelo oxigénio depende da pressão parcial de O_2 (PO_2), que se define em termos da quantidade de O_2 necessária para saturar 50% da hemoglobina, valor P_{50} . Esta relação é bem ilustrada pela curva de dissociação do O_2 da figura 8, a qual indica que a afinidade da Hb desce quando a tensão de O_2 é baixa e sobe quando a tensão de O_2 é alta (Hudnall, 2012).

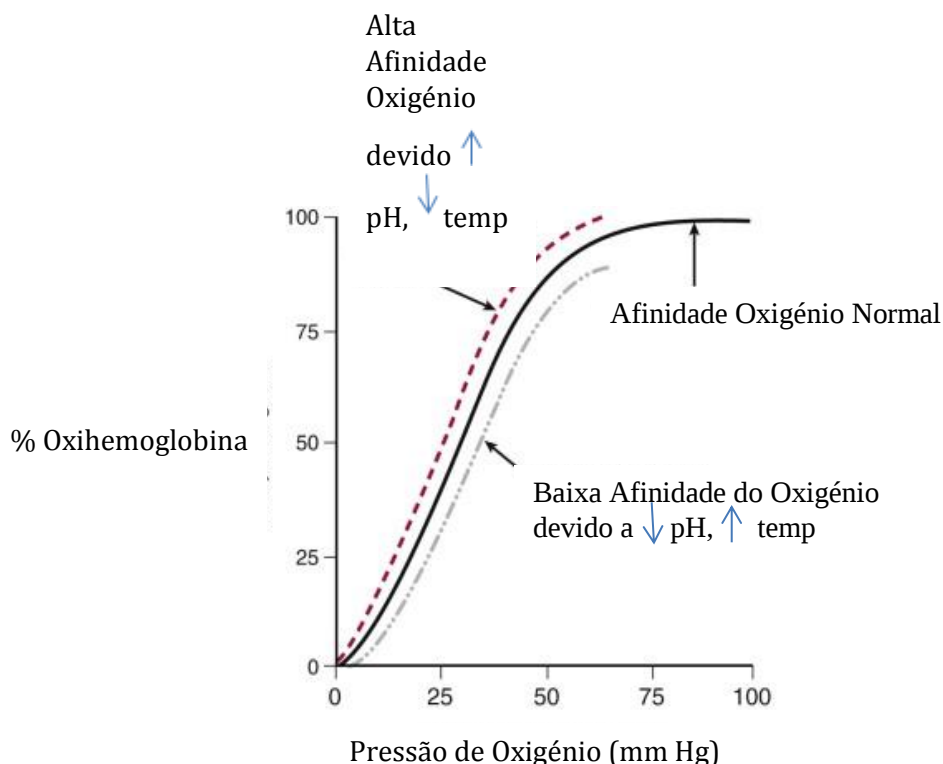


Figura 8: Comportamento da hemoglobina na presença de oxigénio (adaptado de Hudnall, 2012)

A pressão de oxigénio (PO_2) é necessária para libertar o oxigénio. Nos tecidos periféricos, a transferência torna-se mais lenta à medida que a pressão atmosférica de O_2 diminui (Liu, Zhu, Zeng & Nie, 2012).

A concentração do ião hidrogénio (H^+) no sangue pode variar consoante o aumento ou diminuição do CO_2 . Se a concentração de H^+ aumentar e o pH diminuir, o meio torna-se mais ácido, fazendo com que a curva de dissociação se desloque para a direita na figura 9, havendo por isso uma baixa afinidade entre o O_2 e a hemoglobina e consequentemente uma maior libertação de O_2 para as células. O mesmo acontece com a temperatura, isto é, quando a temperatura aumenta, a curva de dissociação desloca-se para a direita, havendo por isso uma maior libertação de O_2 para as células. Quando a temperatura diminui, a curva desloca-se para a esquerda, havendo uma maior afinidade entre o O_2 e a hemoglobina e deste modo uma menor libertação de O_2 para as células (Rodak *et al*, 2012).

Outros fatores que contribuem para alteração da curva à direita são: anemia, hipoxemia crónica e hipertireoidismo, havendo uma maior libertação de O_2 para os tecidos. O

exercício físico provoca o aumento da libertação de CO_2 , aumento de H^+ , aumento da temperatura e da libertação de compostos de fosfato. Assim, a curva de dissociação desvia-se para a direita havendo uma maior libertação de O_2 para as células e tecidos.

No estudo realizado, foram encontrados vários artigos que utilizavam a medida de absorvância da hemoglobina que era libertada, como método de medição da actividade hemolítica. Nesses artigos, eram utilizados três comprimentos de onda.

Como se pode observar de acordo com a figura 9, quando a absorvância é medida para a hemoglobina a diferentes comprimentos de onda, observam-se três picos, correspondentes aos coeficientes máximos de extinção molar.

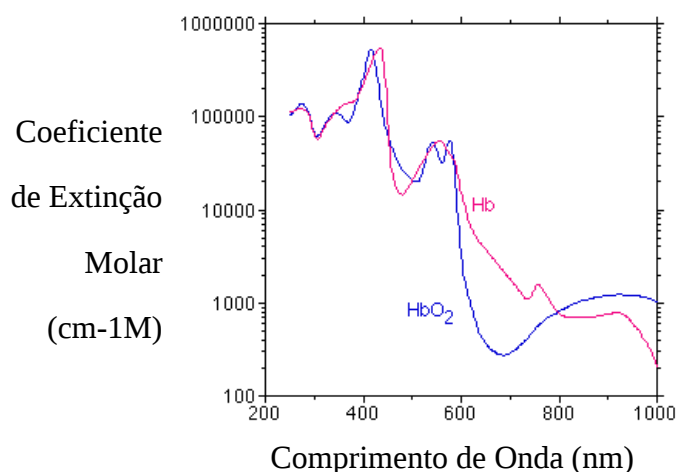


Figura 9: Comparação do espectro de absorção da hemoglobina e oxi-hemoglobina (adaptado de Oregon Medical Laser Center, 2014)

Esses picos encontravam-se próximos dos comprimentos de onda 414 nm e entre o intervalo de 540 nm a 570 nm. Nesse sentido, foi realizada uma pesquisa com vista a perceber o motivo da existência destes picos naqueles comprimentos de onda específicos. Assim, de acordo com o estudo de Liu *et al* (2012) sobre o espectro de absorção específico para a hemoglobina a diferentes níveis de PO_2 , existiam dois picos de absorção a 540 e 576 nm e uma depressão no valor da absorção a 560 nm quando PO_2 é superior a 100 mm Hg. Quando a PO_2 diminui os dois picos (540 nm e 576 nm) diminuem progressivamente e a depressão (560 nm) inverte de sentido e aumenta.

Por outro lado, em relação ao valor da hemoglobina, de acordo com Levitzky (2010), esta encontra-se em cerca de 97,4% saturada para uma PO_2 de 100 mm Hg, sendo que para valores superiores de PO_2 alveolares não se conseguirá uma quantidade significativa de oxigénio.

Foi então possível concluir que, para valores de PO_2 superiores ou próximos a 100 nm, a hemoglobina estaria saturada, apresentando picos de absorvância a 540 nm /570 nm, motivo pelo qual foram adoptados estes comprimentos de onda nos métodos de espectrofotometria de absorção.

1.4 Agentes Causadores da Hemólise

A hemólise compreende a destruição dos eritrócitos que consiste na ruptura da sua membrana que pode ser provocada por factores internos ou factores externos quer *in vivo* como *in vitro*.

Certas deficiências enzimáticas com uma origem hereditária, podem originar uma menor resistência dos glóbulos vermelhos, podendo causar a sua destruição, bem como a falta da enzima glucose-6-fosfato desidrogenase ou piruvato quinase. No caso da primeira, é uma enzima do citoplasma que tem um papel importante no potencial redução oxidação da célula. Nesse sentido, a sua actividade no eritrócito é importante porque fornece glutatião reduzido e NADPH. Nos casos em que esta função não se encontra totalmente operacional, verificou-se que, após a ingestão de alguns fármacos ou favas, ou no caso de o individuo ter alguma infecção ou anemia hemolítica, os indivíduos tiveram casos de hemólise intravascular (Gomes, Biléu & Borges, 2013).

Outra das causas intrínsecas da destruição / hemólise *in vivo*, pode estar relacionada com a membrana dos eritrócitos que apresenta uma forma inadequada. Esta deficiência acontece em certas doenças genéticas hereditárias, tais como a drepanocitose, onde o eritrócito adopta uma forma de foice e onde se verifica uma insuficiente produção de hemoglobina (MSD, 2014).

Outro caso onde o eritrócito adopta uma forma esférica com pequenas dimensões, é a esferocitose hereditária, um tipo de anemia de transmissão hereditária onde as populações mais afectadas são os japoneses e caucasianos. Esta doença é causada por mutações na espectrina α e β , anquirina, banda 3, proteína 4.2 e β -aducina, proteínas da

bicamada lipídica e do citoesqueleto, que mantém uma ligação com as proteínas periféricas e oferecem a deformabilidade e estabilidade ao eritrócito. Associado a estas mutações, verifica-se uma diminuição da densidade de espectrina ao citoesqueleto, levando a menores valores de deformabilidade (Diez-Silva, Dao, Han, Lim, Suresh, 2010).

Pode ainda apresentar uma forma oval ou elíptica causando a eliptocitose hereditária, provocando uma anemia hemolítica que pode apresentar diferentes graus (Hoffbrand & Moss, 2011; MSD, 2014). As causas destas deformações estão relacionadas com mutações na espectrina α e β e na proteína 4.1, que provocam defeitos na membrana horizontal, causando uma diminuição da mesma, provocando assim uma diminuição da estabilidade, durabilidade, elasticidade e deformabilidade da membrana (Diez-Silva *et al*, 2010).

Existem ainda mais casos de outras doenças genéticas, como o caso da talassemia, onde se verifica uma insuficiente produção de hemoglobina, provocando assim uma alteração dos eritrócitos em termos de resistência e forma (Hoffbrand & Moss, 2011).

A hemólise ou desordens hemolíticas referem-se a um aumento da lise / destruição dos glóbulos vermelhos, resultando numa diminuição de eritrócitos em circulação. Este facto vai provocar uma diminuição da oxigenação dos tecidos e um aumento da produção de eritropoietinas pelo fígado (Lichtman *et al*, 2010).

O comportamento do eritrócito *in vivo* e *in vitro* vai ser distinto de acordo com o meio no qual se encontra. Quando por exemplo, o eritrócito se encontra num meio hipotónico, onde existe menor concentração de soluto em comparação com o eritrócito, verificamos que por efeito da pressão osmótica, a água mais facilmente consegue penetrar na membrana, fazendo com que este fique tome facto com possibilidade de eventualmente até sofrer a lise como se pode observar na figura 10 (McGraw-Hill Higher Education, 2000).

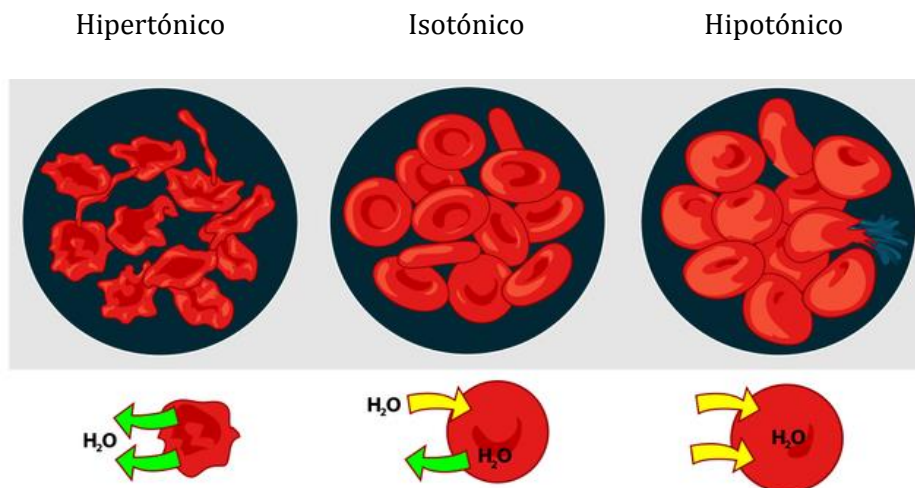


Figura 10: O efeito sobre o eritrócito de pressão osmótica (adaptado de AboutEducation, 2014)

Por outro lado, o glóbulo vermelho, quando se encontra num meio hipertónico, ou seja, quando a concentração salina do meio é maior que a concentração no eritrócito, vai libertar a água que tem dentro de si, não se verificando entrada de nova. Isto vai provocar uma diminuição do tamanho do eritrócito, ficando enrugado, tal como se pode verificar na figura 10 (McGraw-Hill Higher Education, 2000).

Com vista a comparar os efeitos dos diferentes meios nos glóbulos vermelhos, foi analisado o estudo realizado *in vitro* por Zehnder, Schulzki, Goede & Hayes (2008) onde comparou-se o que acontecia a glóbulos vermelhos que eram armazenados para posteriores transfusões, se colocados em diferentes soluções/meios. Neste estudo, analisaram-se as consequências que diferentes meios têm sobre o comportamento de 20 unidades de eritrócitos, que se encontravam com o anticoagulante citrato-fosfato-dextrose, tendo sido registados os resultados no 1º e 42º dias. Os meios adicionados foram uma solução isotónica com fosfato-adenina-glucose-guanosina-salina-manitol (PAGGSM), às 10 primeiras unidades de eritrócitos, e uma solução hipertónica salina-adenina-glucose-manitol (SAGM), às restantes 10 unidades.

Os glóbulos vermelhos que apresentam uma forma normal, podem também ser objecto de hemólise. Neste caso verifica-se a hemólise por serem afectados por fungos, microorganismos, agentes tóxicos, moléculas, compostos sintéticos, agentes terrestres, agentes marinhos ou por substâncias por eles elaborados.

No estudo realizado foram encontrados diferentes agentes hemolíticos com origens díspares, estruturas químicas e maneiras de afectar o eritrócito distintas. Com vista a exemplificar, foram seleccionados agentes naturais, sintético e semi sintético que serão apresentados de seguida

Os agentes hemolíticos naturais estudados foram o veneno de escorpião ou serpente, tendo sido estudado com maior detalhe o fungo *C. albicans*. Os agentes sintéticos e semi-sintéticos foram o fulereno e a fenil-hidrazina, respectivamente.

Em relação à maneira de agir sobre a membrana, estes 3 apresentam diferentes formas de actuar sobre o eritrócito provocando a hemólise. Enquanto a *C. albicans* afecta o lado externo da membrana, o fulereno tem a capacidade de penetrar no eritrócito e atingir a parte interna da membrana, o citoesqueleto. A fenil-hidrazina actua nos dois lados da membrana.

Exemplos de Agentes Hemolíticos Naturais

O veneno do escorpião é uma substancia constituída por mucoproteínas e restos de membranas. Tem um aspecto mucoso, opaco e leitoso (Ci, Farmac & Ribeiro, 2007). Os principais componentes do veneno de um escorpião são as neurotoxinas, bem como diferentes tipos de péptidos.



Figura 11: Imagem de escorpião (*Maurus*) (Ciência Hoje, 2014)

O veneno tem fosfatase ácida, ribonuclease, hialuronidase, acetilcolinesterase e fosfolipase A. Outro dos componentes do veneno são as neurotoxinas, sendo estas diferentes tipos de péptidos que vão ser responsáveis por alterar o funcionamento normal dos canais de Na^+ , K^+ , Ca^{+2} e Cl^- (Ci *et al.*, 2007).

Outro agente hemolítico que foi estudado foi o veneno de serpentes do género *Crotalus*, onde os principais componentes são a crotoxina, crotamina, convulxina e girotoxina, sendo a maior proporção a da crotoxina. Esta última tem a fosfolipase A2 (básica) e crotapotina (ácida). A função da fosfolipase A2 é a de apresentar actividade neurotóxica (Moio & Martins, 2012).

De acordo com o estudo de Mebs & Ownby (1990), a necrose e lise das células do músculo esquelético podiam ser provocadas por veneno de cobra. Os componentes do veneno podiam ser dois. Um deles era uma cadeia simples de peptídeos de 42-44 resíduos de aminoácidos e o outro era a fosfolipases A2 que poderia representar tanto proteínas de cadeia simples ou existente como complexos de várias subunidades da enzima.

Estas toxinas seriam responsáveis pela existência de uma interacção com a membrana plasmática que alteraria a permeabilidade da membrana plasmática, sendo responsáveis pela sua destruição. Esta permeabilidade acontecia devido à afinidade que algumas fosfolipases do veneno de cobra teriam com as células musculares esqueléticas (Mebs & Ownby, 1990).

Outro componente presente é a crotamina que é constituída por 42 aminoácidos, sendo um polipéptido. Esta actua nas membranas das fibras musculares causando necrose no tecido muscular, bem como provocar paralisia espasmódica.

Temos mais dois componentes do veneno da serpente, sendo duas glicoproteínas, a convulxina e a girotoxina. A primeira pode provocar uma agregação das plaquetas, isquemia, convulsões e morte. A segunda assemelha-se a uma enzima similar à trombina com actividade esterásica e fibrinogenolítica (Moio & Martins, 2012).

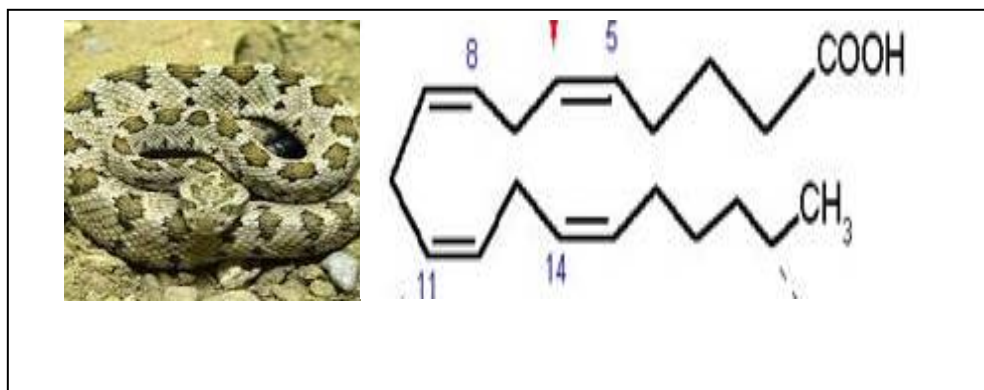


Figura 12: Imagem de serpente (*Crotalus*) e de fórmula química da fosfolipase 2 (Ibc Bioquímica, 2014)

De acordo com o estudo de Vargas, Londono, Quintana, Rua, Segura, Lomonta & Nuñez (2012) veneno de serpente é uma mistura complexa de proteínas entre as quais fosfolipases básicas e ácidas A2 (PLA2s), sendo as primeiras as que apresentam maior toxicidade. Nesse estudo, uma nova PLA2 foi purificada a partir de um veneno da serpente (*Porthidium nasatum*) por meio do método de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa. Na sequência deste estudo, foram caracterizados 3 péptidos trípticos desta proteína, onde a nova PLA apresentava actividade hemolítica indirecta em gel de agarose contendo gema de ovo e eritrócitos.

Para além destes organismos, foi analisada a actividade hemolítica da *C. albicans* com maior detalhe, tendo sido estudado qual o agente causador da hemólise.

De acordo com o trabalho realizado por Manns, a *C. albicans* quando se encontra em agar de sangue enriquecido em glucose, apresentava actividade hemolítica que estava presente em organismos intactos e que eram liberados para o meio. A hemoglobina que era libertada, depois de ter sido realizada a hemólise, iria restaurar o crescimento inibido-transferrina. Nesse estudo, foi concluído que que a *C. albicans* adquiria ferro a partir dos eritrócitos lisados (Manns, Mosser & Buckley, 1994).

De acordo com um estudo de Watanabe, a hemólise é desencadeada por uma manoproteína da *C.albicans in vitro*, sendo o eritrócito destabilizado através da proteína banda 3 que se encontra na sua membrana parte externa. A manoproteína liga-se à proteína banda 3 do eritrócito, sendo a Lys-539 ou Lys-542 o local onde a ligação se verifica. Esta proteína vai catalisar a troca aniónica, encontrando-se associada com anquirina através de espectrina (Watanabe *et al*, 1999).

Nesse estudo, o sobrenadante da cultura de *C. albicans* foi misturado com eritrócitos humanos, tendo sido medido o grau da actividade hemolítica. Tal como se pode ver na figura, o factor / manoproteína que provoca a hemólise foi excretado passado 2 dias de incubação. Os valores da percentagem da actividade hemolítica variaram entre 8% e 23%, como se pode ver na figura 13.

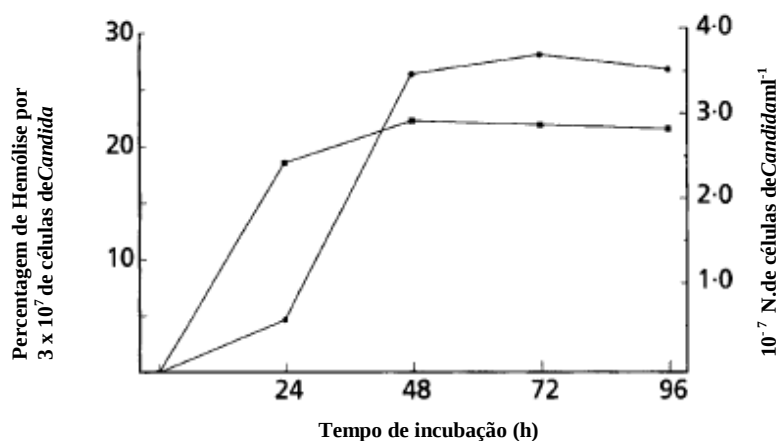


Figura 13: Percentagem de hemólise de acordo com o tempo 0 de incubação (adaptado de Watanabe *et al*, 1999)

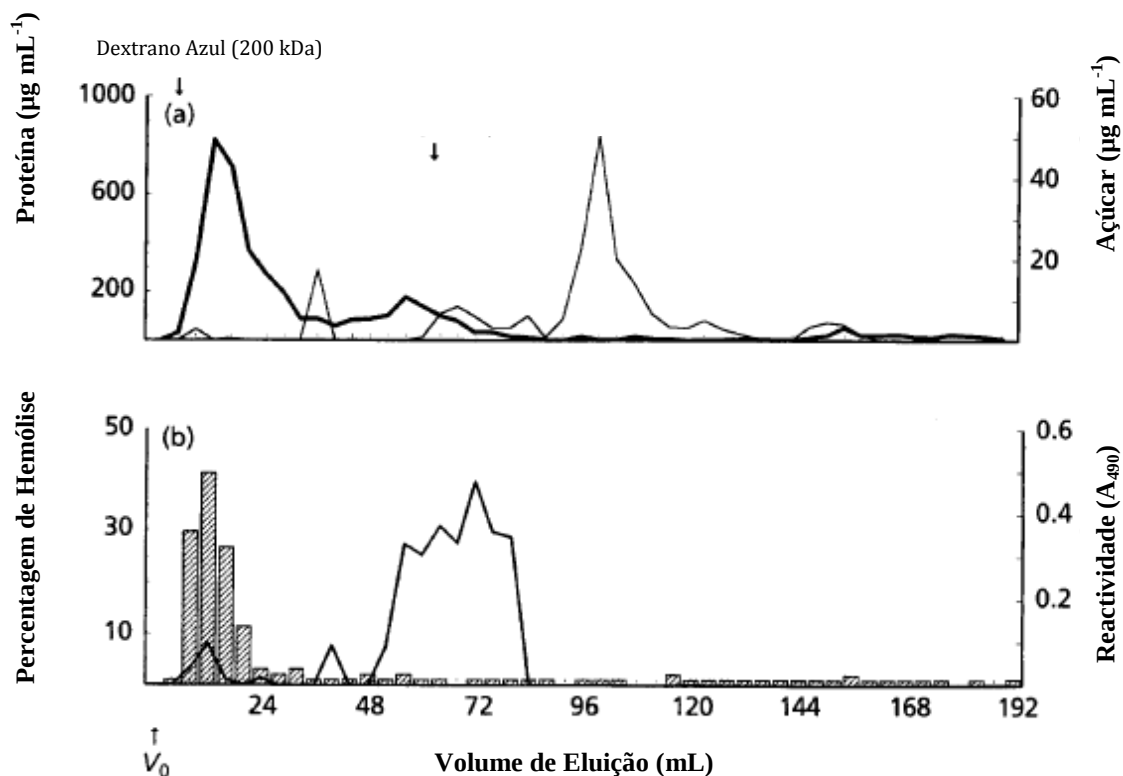


Figura 14: a) Proteína versus açúcar b) Percentagem de hemólise versus reactividade (adaptado de Watanabe *et al*, 1999)

No mesmo estudo, com vista a verificar qual o efeito na actividade hemolítica, foram analisados o conteúdo de proteína total e o teor de açúcar de acordo com o volume diluído, sendo a primeira a linha fina e a segunda a linha mais grossa da figura 14 a). Tendo sido detectada actividade hemolítica na fracção de 200 kDa do açúcar. Na figura 14 b), as barras representam o grau de hemólise alcançado. Com vista a detectar qual das fracções continha a manoproteína, foram realizados testes adicionais com ELISA. A reactividade foi testada com anti-soro contra o factor do género *Candida*, sendo representada pela linha na figura 14 b).

No mesmo estudo, Watanabe *et al* (1999) defendeu que esta actividade era provocada pela manoproteína *in vitro*, o que já não acontecia *in vivo*, uma vez que não era detectada a presença de manoproteínas em quantidades elevadas em doentes com candidíase. Apesar de hemólise não ser causada pela manoproteína *in vivo*, a hemólise poderia aumentar o crescimento da *C. albicans* dado que a hemoglobina é um factor de crescimento do fungo.

Num estudo de Yenişehirli, Bulut & Tuncoglu (2010), foi dada uma prova clínica da actividade *in vivo* da *C. albicans*. Neste estudo, o autor pretendia determinar as actividades de fosfolipase, proteinase e hemolítica da *C. albicans* que tinha sido isolada a partir de 147 doentes, em todos eles foi revelada actividade beta-hemolítico (caracterizado por uma lise completa das hemácias) em agar Sabouraud dextrose com um suplementado de 7% de sangue de carneiro fresco e 3% de glicose.

Mais recentemente, segundo o trabalho realizado por Okamoto-Shibayama, Kikuchi, Kokubu & Ishihara (2014), a Csa2 está relacionada com a absorção do ferro à partir da hemoglobina e proteínas heme que são realizadas pela hifa da *C. albicans*. A Csa2 é uma proteína que é comum na membrana extracelular de vários fungos e bactérias, sendo membro da família da proteína Rbt5 da *C. albicans*.

A estrutura da Csa2 foi estudada no artigo de Lintner, Kerou, Brunfield, Graham, Liu, Naismith & Lawrence (2011) onde foi descrita como um protomero, unidade estrutural de uma proteína oligomérica. Esta proteína é constituída por 102 aminoácidos (Grabowska, 2011). O domínio central é constituído por uma cadeia de cinco antiparalelos β (6, 7, 1, 8 e 9) rodeados por quatro hélices α , como se pode observar na figura 15. As quatro ligações em conjunto com as hélices 2 e 8, preconizam um domínio de ligação RNA, zona onde a proteína realiza a complexação.

Para além das proteínas, existem também saponinas (glicosídeos) ou algas como a *Ulva fasciata* que podem apresentar actividade hemolítica como se demonstrará no tópico 2.2.

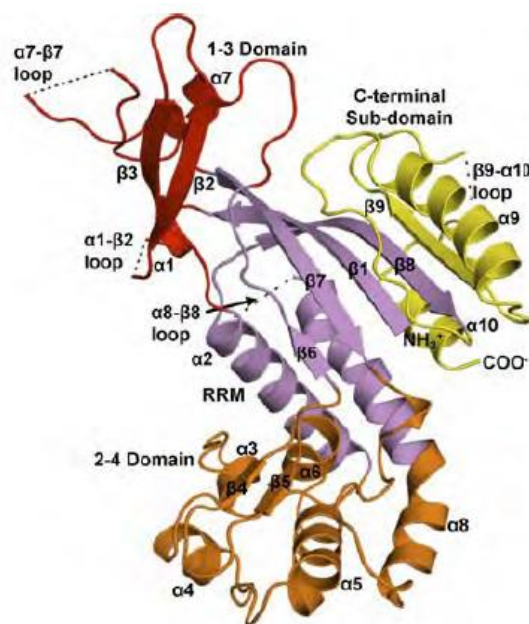


Figura 15: Estrutura da Csa2 (Lintner *et al*, 2011)

Exemplo de Agente Hemolítico Sintético

Na análise efectuada existiam também diversos agentes hemolíticos que são compostos sintéticos, de entre os quais temos o fulereno e seus derivados. Nesse sentido, irá ser apresentada uma breve descrição do fulereno, bem como as características da sua interação com o eritrócito e quais os mecanismos da actividade hemolítica.

Esta molécula é composta por cerca de 60 átomos de carbono (C_{60}) que estão ligadas entre si por ligações simples ou duplas (Encyclopaedia Britannica, 2014). Devido à sua estrutura, tornou-se muito atractiva para a indústria farmacêutica com a possibilidade de veicular fármacos ao ser utilizada em injeções intravenosas, o que tem um impacto imediato no sangue, sendo por isso importante estudar a sua toxicidade (Tramer, Daros & Passmonti, 2012). A sua aplicabilidade pode ser diversa, tais como antioxidante, citotóxico ou agente veiculador de fármacos.

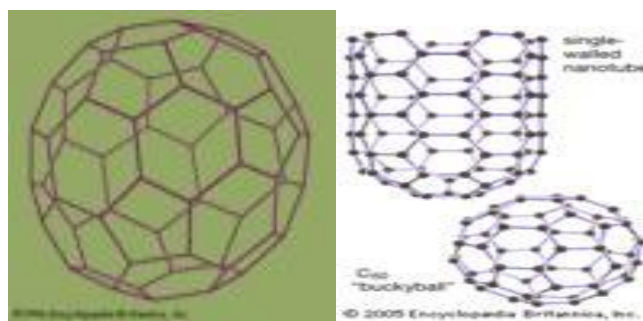


Figura 16: Estrutura química da fulereno (EncyclopediaBritannica, 2014)

O fulereno é composto por uma série de moléculas de carbono que formam uma espécie de uma estrutura em forma de gaiola ou de cilindro que no seu interior é oca, tal como se pode observar na figura 16 (Encyclopaedia Britannica, 2014). O ponto de fusão é de 280°C sendo sensível à luz, é estável, altamente inflamável e incompatível com agentes oxidantes fortes (Chemical Book, 2007).

O fulereno é capaz de gerar espécies que são reactivas ao oxigénio, o mesmo pode ser colocado em água por complexação com tensioactivos ou extracção por solventes. No entanto, esta estrutura química pode ser objecto de várias ligações de diversos grupos funcionais que alteram as características do núcleo, sendo importante avaliar a toxicidade e eventual actividade hemolítica (Trpkovic, Todorovic-Markovic, Kleut, Misirkic, Janjetovic, Vucicevic & Trajkovic, 2012).

De acordo com o estudo de Bosi, Feruglio, Ros, Spalluto, Gregoretti, Terdoslavich, Decoti, Passamonti & Prato (2004), uma série de fulerenos solúveis em água foram investigados, tendo sido concluído que a presença de porções neutras ou aniónicas não tinha qualquer impacto, o que já não acontecia com as cadeias catiónicas que induziam toxicidade significativa.

No estudo realizado por Trpkovic *et al* (2010), foram testadas diferentes suspensões aquosas de fulereno C₆₀ previamente dissolvidas em tetra-hidrofurano (THF) nC₆₀THF, outra em gama-ciclodextrina nC₆₀CDX ou outra ainda com copolímero etileno acetato-etileno vinil versata (nC₆₀EVA–EVV), como será abordado com maior detalhe nos tópicos 2.5 e 2.6.

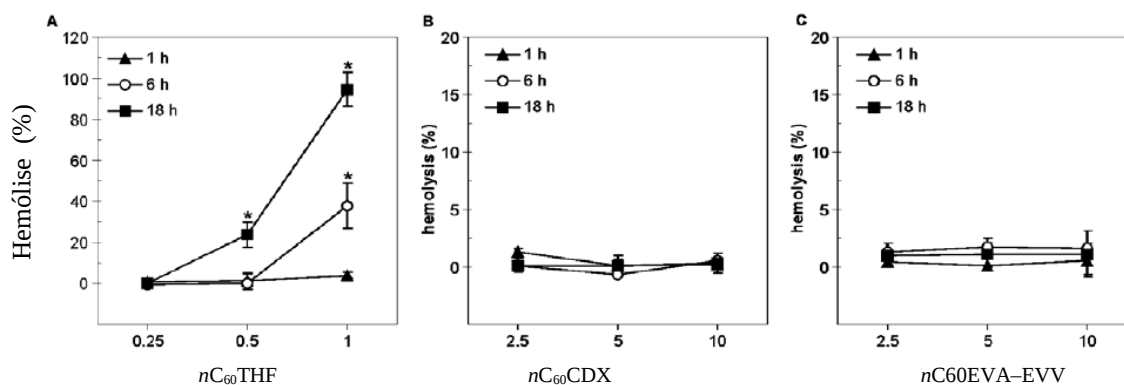


Figura 17: Hemólise provocada por nC₆₀THF, nC₆₀CDX e nC₆₀EVA-EVV (adaptado de Trpkovic, 2010)

Neste estudo foram incubados os derivados do fulereno juntamente com os eritrócitos humanos durante 1h, 6h e 18h, seguida de análise da cor da hemoglobina libertada. De acordo com essa análise, apenas o THF provoca hemólise, sendo que os restantes derivados do fulereno não a provocavam (Trpkovic *et al*, 2010). Tal como se pode ver na figura 17 a), verificou-se que existia hemólise com uma concentração de 0,5 µg / mL às 18 horas de incubação e com uma concentração de 1 µg / mL às 6 horas e 18 horas.

O autor apresenta uma hipótese para explicar o dano provocado ao eritrócito. O nC₆₀THF tendo uma afinidade elevada, vai ligar-se à membrana do mesmo. Isto vai levar a um aumento da produção de espécies reactivas de oxigénio devido à perodixação lipídica (Trpkovic *et al*, 2010).

O eritrócito vai ficar desidratado devido ao desequilíbrio osmótico, o que irá causar uma redução no tamanho da célula devido à ligação às proteínas espectrina e actina do citoesqueleto. Com o evoluir do tempo e do dano à membrana do eritrócito, verificou-se a libertação de hemoglobina ocorrendo a hemólise (Trpkovic *et al*, 2010).

Exemplo de Agente Hemolítico Semi-Sintético

A fenil-hidrazina é utilizada como um componente da indústria farmacêutica, agroquímica ou química, tal como se pode observar na tabela 4 (WHO, 2000), sendo responsável por algumas doenças devido ao contacto com a mesma. Algumas dessas doenças são a dermite eczematiforme de contacto ou traumática, anemia hemolítica ou asma brônquica (Portal Codificação dos GDH, 2002).

Tabela 4: Utilização da fenil-hidrazina na Europa Ocidental (adaptado WHO, 2000)

Utilização de Fenil-hidrazina (%)		
Indústrias	Europa Ocidental (1988)	Alemanha (1990-1992)
Farmacêutica	37,6	70,2
Agroquímica	42,9	7,2
Corantes	15	21,8
Outros	4,5	0,8

A Fenil-hidrazina é um composto químico com a fórmula de $C_6H_8N_2$, apresentado a estrutura da figura 18. A massa molecular é de 108,14 g/mol, a densidade é de 1,0978 g/cm³ e o ponto de fusão é de 19,5°C.

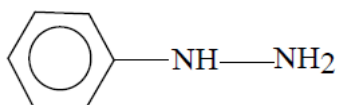


Figura 18: Estrutura química da fenil-hidrazina (WHO, 2000)

O mecanismo pelo qual o contacto com o composto provoca anemia hemolítica, foi estudado por Shetlar & Hill (1985), onde foi defendido que isso acontecia devido à reacção da fenil-hidrazina com a hemoglobina. A oxihemoglobina ao reagir com a fenil-hidrazina gera um N-fenil-protoporfirina, onde o componente heme da hemoglobina fica alterado, como se pode observar na figura 19.

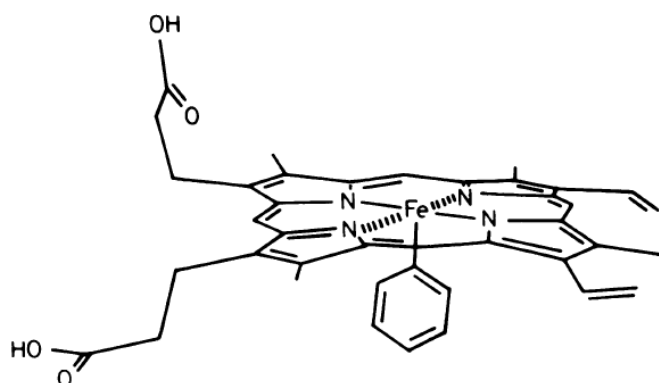


Figura 19: Reacção da fenil-hidrazina com a hemoglobina (Shetlar & Hill, 1985)

De acordo com Shetlar & Hill (1985), a fenil-hidrazina ao sofrer uma reacção de oxidação, vai catalisar a broxihemoglobina nos eritrócitos produzindo elevados níveis de peróxido de hidrogénio, bem como pode levar ao aparecimento de alguns produtos, entre estes encontram-se diversos radicais de fenil. Estes radicais vão estar envolvidos na peroxidação lipídica da membrana do eritrócito.

De acordo com Hill & Thornalley (1981), os radicais livres podem ser produzidos na membrana ou vão ser difundidos para a membrana. Neste estudo é defendido que a actividade tóxica da fenil-hidrazina se deve ao ataque que estes radicais realizam à membrana.

Neste mesmo estudo, foram encontrados nos reticulócitos (fase anterior do desenvolvimento do eritrócito) de animais elevados níveis de lípidos que foram peroxidados e polímeros de espectrina. Era também defendido que a integridade do eritrócito tinha sido perdida devido a polimerização da espectrina.

2. MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE HEMOLÍTICA

A pesquisa foi realizada no Google Académico com as seguintes palavras *hemolytic activity method*, *hemolytic activity determination* e *hemolytic activity detection*. Quando a investigação se encontrava restringida aos artigos posteriores a 2010 e truncada para as palavras *hemolytic activity method*, aparecia apenas 1 artigo, quando eram *hemolytic activity determination* apareceriam 14 artigos e finalmente para *hemolytic activity detection* apareciam 6 artigos.

Nesse sentido, foi necessário ampliar a mesma e truncar apenas *hemolytic activity*, nesta altura apareciam 9.750 artigos. No entanto, quando era utilizada a palavra *method* associada a *hemolytic activity*, o método nem sempre estava relacionado com o objectivo deste trabalho. O mesmo aconteceu na pesquisa para *determination* e *detection*.

No passo seguinte, foram seleccionados os artigos que apresentavam os procedimentos adoptados nos métodos de determinação da actividade hemolítica, tendo sido analisados independentemente de se confirmar a sua existência e do número de métodos utilizados. A análise recaiu assim sobre 36 artigos.

No estudo que foi realizado foram encontrados 8 métodos de determinação da actividade hemolítica, sendo maioritariamente realizados *in vitro* como se pode comprovar na tabela 9. Os métodos que realizam estudos *in vivo* foram 2, representado 5,5% dos artigos analisados.

Tabela 5: Resumo dos métodos de determinação da actividade hemolítica do estudo realizado

	Método	Artigo
<i>In Vitro</i>	Citometria de fluxo	(Trpkovic <i>et al</i> , 2010)
	Deteção visual da actividade hemolítica	(Priyadharshini, Bragadeeswaran, Prabhu & Ran, 2011)
	Espectrofotometria com medição da absorvância a 414 / 415 nm	(Fan, Yoshida, Honda, Matsumoto, Sawada, Hattori, ... & Fujimura, 2013); (Feng, Yu, Xing, Liu, Wang, Cai & Li, 2010); (Kotmakchiev, Kantarci, Cetintas & Ertan, 2012); (Ling & Trick, 2010); (Li, Yu, Feng, Xing, Liu, Wang, Qin, Li & Li, 2011); (Tatters, Van Wagoner, Wright & Tomas, 2012);
	Espectrofotometria com medição da absorvância a 540 / 570 / 576 nm	(Antunes, Imperi, Carattoli & Visca, 2011); (Arzanlou, Bohlooli, Jannati & Miranejad-Asl, 2011); (Chachra, Coote, Partoon & Jand, 2011); (Colomer, Pinazo, Manresa, Vinardell, Mitjans, Infante & Pérez, 2011); (Di-Qiang, Zheng, Guang, Jian-Feng, Ying-Kun, Jing-Xian, Ting-Guo, 2011); (Hisamatsu, Nagao, Unno, Goda & Hatakeyama, 2013); (Huang, Wang, Wang, Liu & Chen, 2011); (Jiang, Vasil, Gera, Vasil & Hodges, 2011); (Kao, Lin & Chang, 2010); (Lin, Y.-S., Haynes, C., 2010); (Ling & Trick, 2010); (Locock, Michl, Valentin, Vasilev, Hayball, Qu, Traven, Griesser, Meagher & Haeussler, 2013); (Louati, Krayem, Fendri, Aissa, Sellami, Bezzine & Gargouri, 2013); (Min, Yan, Zhang, Ye, Zhong, Cao, Zou & Chen, 2014) ; (Ng, Tan, Leong, Voo, Hedrick & Yang, 2014); (Rattanama, Thompson, Kongkerd, Srinithiwarawong, Vuddhakul & Mekalanos, 2012); (Sasaki, Hiraoka & Kobayashi, 2010); (Singh, Gangwar, Kumar, Nath & Pratap, 2013); (Souza, Jain, Galdhar, Samad, Degani & Devaraajan, 2013); (Spaller, Trieu & Almeida, 2013); (Tomita, Kamio & Ohta, 2011); (Trpkovic <i>et al</i> , 2010); (Wei, Chi, Meng, Chen, An, Wang & Zhang, 2013); (Yang, Liu, Wang, Liu, Wang, Wang, Wang & Liu, 2012); (Yildirim, Ozgur & Bayindir, 2013)
	Medição dos halos de hemólise	(Rossoni, Barbosa, Vilela, Cardoso & Junqueira, 2013); (Seker, 2010); (Yigit, Aktas, Dagistan & Ayyildiz, 2011);
	Microscopia de força atómica	(Trpkovic <i>et al</i> , 2010)
<i>In Vivo</i>	Deteção visual de actividade	(Weldon & MacKessy, 2012)
	Medição de halos hemorrágicos	(Calzia, Ravera, Aluigi, Falugi, Morelli & Panfoli, 2011)

Os métodos que realizaram estudos *in vitro* foram o da espectrofotometria, citometria de fluxo, microscopia de força atómica, detecção visual da actividade hemolítica e medição dos halos de hemólise. Em relação aos métodos como um todo, o mais utilizado é aquele que mede a absorvância da hemoglobina que é libertada através de espectrofotometria, onde são usados diversos comprimentos de onda.

Os estudos *in vivo* utilizaram a medição dos halos hemorrágicos e a observação visual de uma reacção hemorrágica.

De entre os 8 métodos, destacam-se 2 por possibilitarem uma análise mais completa, uma vez que fornecem informação sobre a identidade, aspecto e forma do eritrócito, bem como sobre a quantidade de hemácias associada. Estes métodos são a citometria de fluxo e microscopia de força atómica.

Com vista a sistematizar a apresentação, os métodos vão ser apresentados por uma ordem crescente de complexidade em termos de requisitos necessários para a sua execução, bem como em termos de resultados para análise. Em cada um deles, numa primeira fase vão ser apresentados os princípios dos mesmos e numa etapa seguinte os respectivos procedimentos.

2.1 Detecção Visual de Actividade Hemorrágica *in vivo*

Princípio do Método

Numa primeira fase deste estudo foi directamente provocada a actividade hemorrágica tendo sido visualizada directamente por observação.

Numa segunda fase foi utilizado como método a microscopia óptica para visualizar a actividade hemorrágica provocada, bem como a necrose em tecidos. A análise é realizada através da fixação das amostras, posterior seccionamento e coloração maioritariamente em hematoxilina eosina, sendo a análise realizada microscopicamente (Histology and Virtual Microscopy, 2010).

O olho humano apresenta diferente capacidade de detecção da cor, consoante o comprimento de onda. Conforme referido por Ryer & Light (1997), a maior sensibilidade situa-se em 555 nm, em que o olho humano pode detectar um fluxo de

cerca de 10 fotões por segundo; o que corresponde a uma energia radiante de $3,58 \times 10^{-18}$ W (ou J s^{-1}). Nos comprimentos de 450 nm e 650 nm, o olho pode detectar um fluxo mínimo de 214 e 126 fotões por segundo, respectivamente. Verifica-se assim que os comprimentos de onda relacionados com a detecção da hemoglobina a 540 e 570 nm estão próximos da sensibilidade máxima.

Execução do Ensaio Hemolítico

Este método foi utilizado no artigo de Weldon & MacKessy (2012) realizado *in vivo*, tendo sido injectado intradermicamente veneno liofilizado de serpente (*Alsophis portoricensis*), ou da proteína purificada *alsophine*, uma metaloprotease, do veneno da mesma serpente dissolvido em 25 μl de 0,9% solução estéril e salina em 4 fêmeas idosas de murgancho (*Mus musculus*). As doses foram administradas em duplicado, a 0 (controlo), 0,1 – 0,5 – 1,0 – 5,0 e 10,0 μg . Passadas 2 horas de incubação, as fêmeas foram eutanasiadas com CO_2 .

De seguida, a pele foi removida e a superfície interna foi fotografada, verificando-se uma hemorragia ou uma hemorragia intramuscular tal como se pode ver na figura 20.

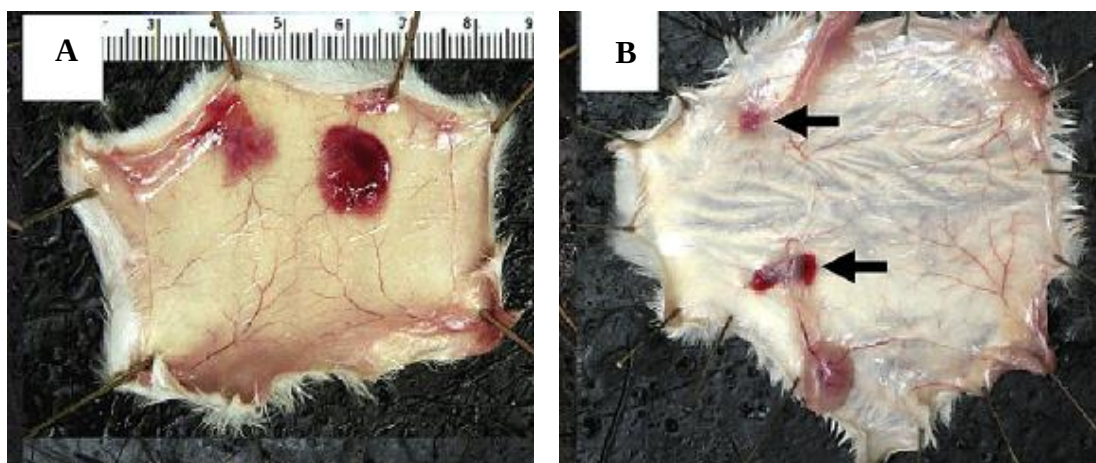


Figura 20: a) Superfície interna da pele do *M. musculus* com 5,0 μg de veneno liofilizado de serpente (*Alsophis portoricensis*) b) 5,0 μg e 10,0 μg da metaloprotease *alsophine* (adaptado de Weldon & MacKessy, 2012)

Tal como se pode observar na figura 20 A e B, em ambos os casos verificou-se hemorragia. No caso da figura A, onde o agente hemolítico era extracto bruto do veneno da serpente, foi possível visualizar no local onde foi administrado uma grande hemorragia. No caso da figura B, onde o agente hemolítico era a proteína isolada,

alsophine, a hemorragia foi intramuscular. Esta não foi visualizada na superfície interna da pele mas sim na descoloração dos músculos intercostais, motivo pelo qual aparentemente os efeitos da superfície dérmica são inferiores em B. No artigo não foram apresentadas fotografias com o efeito provocado nos músculos intercostais.

Foi também investigado danos locais e sistémicos, tendo sido injectado directamente no músculo, *alsophine* (1,0 µg e 4,0 µg) e veneno liofilizado de serpente (5,0 µg e 10,0 µg), administrados por bolus. Passadas 12h, os murganhos foram eutanasiados com CO₂, tendo sido realizados exames histológicos dos tecidos pulmonares e gástricos. Em ambos os casos, os eritrócitos extravasaram os vasos sanguíneos e provocaram necrose em nos tecidos examinados (Weldon & MacKessy, 2012).

2.2 Detecção Visual da Actividade Hemolítica *In Vitro*

Princípio do Método

Este método permite uma análise rápida a um número elevado de amostras, sendo utilizado numa fase preliminar de um estudo como *screening* dos agentes hemolíticos e amostras. O 96-well ‘V’ *bottom microtitre plate*, adiante designado como suporte para 96 micro amostras, é usado na análise de diversas amostras. Este dispositivo é uma microplaca feita de poliestireno com 96 poços transparentes, sendo possível detectar visualmente directamente e simultaneamente a existência ou não de hemólise. Tem o comprimento de $127,76 \pm 0,15$ mm e altura de $85,48 \pm 0,15$ mm, com uma curvatura aproximada de 200 µm, como se pode observar na figura 21 (Thermo Scientific, 2014). Foi encontrado em apenas 1 dos artigos analisados onde eram comparados os eritrócitos de galinhas com os de caprinos quando era provocada a actividade hemolítica.



Figura 21: NuncTM Edge 96-Well Plate (Thermo Scientific, 2014)

Este método consistiu em misturar o agente hemolítico com a amostra que se estava a analisar em cada um dos poços, tendo sido colocada a placa em ligeiramente agitação durante 2h.

Durante este processo, verificou-se a actividade hemolítica, tendo-se considerado que caso um poço apresenta-se uma suspensão vermelha, iria ser considerada a presença de hemólise. Por outro lado, caso se verificasse a formação de uma aglutinação, nesse caso não iria ser considerada a formação de hemólise (Priyadharshini *et al*, 2011).

Execução do Ensaio Hemolítico

Foi adicionado à amostra de eritrócitos EDTA. De seguida foi centrifugada esta mistura três vezes a 5.000 rpm durante 5 minutos. Para obter uma amostra de 1% de suspensão de eritrócitos foi adicionado 99 mL de solução de soro fisiológico e 1 mL de eritrócitos concentrados nuns de galinha e noutros de cabra (Priyadharshini, *et al*, 2011).

O teste da actividade hemolítica foi realizado num ensaio no suporte para 96 micro amostras. Foram utilizadas duas diluições de muco dos extractos de uma alga (*Ulva fasciata*) em 100 µl de água salina, como abordado anteriormente no tópico 1.4. O passo seguinte, consistiu em adicionar 100 µl de 1% de eritrócitos em todos os poços.

Os pratos foram levemente mexidos e permaneceram durante 2 horas à temperatura ambiente (Priyadharshini *et al.*, 2011).

O resultado considerava que a suspensão com cor vermelha uniforme nos poços, iria ser considera como uma hemólise positiva. Caso contrário, se no fundo do poço existisse alguma formação, era considerado como negativo. Neste estudo, verificou-se que o sangue de galinha era o mais vulnerável à ocorrência de hemólise (Priyadharshini *et al.*, 2011).

2.3 Medição dos Halos de Hemólise *In Vitro*

Princípio do Método

O meio de ágar de dextrose Sabouraud é utilizado porque favorece o crescimento de fungos devido ao pH baixo, sendo a selectividade aumentada para fungos com a adição

do cloranfenicol (antibiótico de largo espectro que inibe o crescimento de bactérias). A dextrose vai funcionar como uma fonte de energia para o desenvolvimento do fungo (BBL, 2012).

Este é um meio não selectivo para cultura e manutenção de fungos patogénicos e não patogénicos, favorecendo o crescimento do fungo *C. albicans* (BBL, 2012).

Nos estudos analisados, é utilizado numa primeira fase o ágar de dextrose Sabouraud para promover o crescimento do fungo e numa segunda fase foi realizada uma suspensão com a *Candida*, tendo sido inoculadas num ágar enriquecido com sangue.

A análise deste método consistiu na verificação visual, ou através da utilização de um microscópio com um software de recolha de imagem (Lou *et al*, 2001), da existência de halos de hemólise provocados pelo fungo, como se pode observar na figura 22. O custo aproximado desse equipamento é de 7 mil euros.

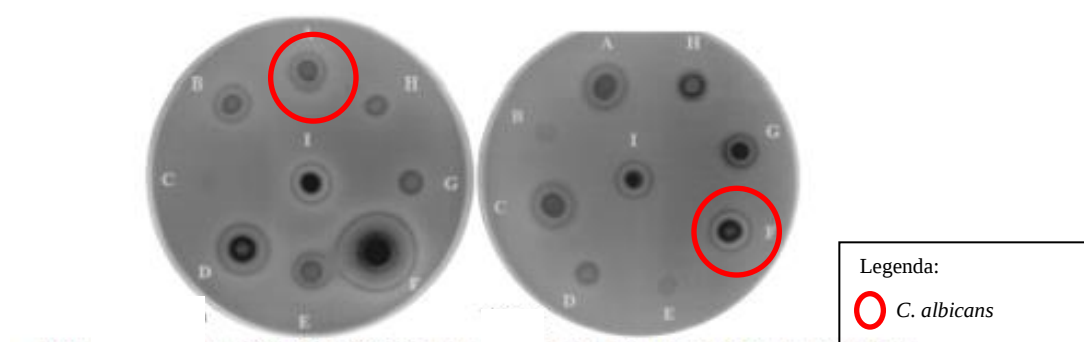


Figura 22: Fotografia representativa da hemólise provocada por diversas espécies de *Candida* no agar com sangue de ovelha (adaptado de Lou *et al*, 2001)

No estudo de Seker (2010), no caso de ter um halo translucido e bem distinto ou um anel preto esverdeado ao redor do local onde foi inoculada a amostra, considera-se que existia actividade hemolítica.

Foram medidos os halos onde se verificasse que existia hemólise. Esta medição teve como objectivo avaliar a intensidade da mesma. O diâmetro do halo translucido foi dividido pelo diâmetro da colónia, este quociente podia ser igual ou superior a 1, sendo utilizado como índice hemolítico.

O método que serviu de referência para este estudo foi descrito por Luo, Samaranayake & Yau, (2001). Para a medição dos halos, os autores utilizaram um sistema

computadorizado de análise de imagem, Quantimet 500 Qwin da Leica. Na medição dos halos são utilizadas lentes de resolução elevada, por exemplo, com a capacidade de captar 1280 x 1024 pixels (Nikon, 2014).

Execução do Ensaio Hemolítico

Este método foi utilizado em apenas três estudos analisados, todos eles para o estudo do fungo *Candida*.

O primeiro passo consistia na preparação da amostra, no caso de Yigit *et al* (2011) na mucosa do palato por baixo da dentadura de 71 doentes (31 mulheres e 39 homens). Os passos seguintes foram similares aos já descritos, tendo sido inoculadas num ágar enriquecido com sangue de ovelha (Yigit *et al*, 2010; Seker, 2010) ou sangue humano (Rossoni *et al*, 2013).

No caso do estudo de Yigit *et al* (2011), foi realizada uma medição do diâmetro dos halos que apareceram nos ágaros tendo sido calculada a média e desvio padrão. Esta medida foi realizada 3 vezes, tendo sido calculada a média $\pm$ o desvio padrão. No caso da *C. albicans*, apenas foram identificadas β hemólise, tendo sido alcançado o valor de 21 ($2,22 \pm 0,12$) (Seker, 2010).

No estudo de Lou *et al* (2001) foram testadas a actividade hemolítica de 14 estirpes do fungo *Candida*, em 8 casos verificou-se a existência de β hemólise (lise completa das hemácias) sendo a *C. glabrata* a que apresentava maior actividade, seguida da *C. albicans*.

No entanto no estudo de Yigit *et al* (2011), onde foram testadas 5 estirpes de *Candida*, 4 apresentavam β hemólise. A *C. albicans* apresentava maior actividade hemolítica do que a *C. glabrata*, uma vez que se encontrava em maior número.

2.4 Medição dos Halos Hemorrágicos *In Vivo*

Princípio do Método

Este método também utilizou a medição do diâmetro do halo que era provocado pela actividade hemorrágica, uma vez que foi realizada *in vivo* em ovos de galinha fertilizados.

A actividade hemorrágica foi provocada por um agente hemolítico, neste caso o veneno de serpente que foi colocado em contacto com o saco vitelino. Ao colocar o veneno em contacto com o mesmo, era provocado um halo detectado visualmente.

Execução do Ensaio Hemolítico

Este método foi realizado *in vivo* por Calzia *et al* (2010) em ovos de galinha fertilizados.

Os ovos fertilizados foram recolhidos no dia 1 e incubadas a 37° C até ao dia 4 num incubador húmido. De seguida, as cascas dos ovos foram limpas com etanol a 70%, e as cascas sob as quais existia um saco de ar foram removidas para expor o saco vitelino vascularizado.

Foi utilizado veneno de serpente (*Crotalus atrox*) diluído em tampão fosfato salino (PBS) com diferentes concentrações (0 a 400 ng). Um volume de 1,5 µl foi aplicado em discos de papel de filtro Whatman número 2.

Cada disco foi pousado na membrana do saco vitelino sobre uma das veias bilaterais major como se pode observar na figura 23 (Calzia *et al.*, 2011).

Neste caso, foi considerada a medição de uma coroa de 2 mm do halo criado como uma dose hemorrágica standard (SHD). Tendo sido tratadas com valores diferentes a SHD e SHD x100 (0-1 mA) com uma baixa voltagem (0-10 V) e aplicado aos discos de papel de filtro já descritos.

Foram aplicados 20 µg de veneno na figura 24 A. No caso B, foram aplicados 20 µg de veneno previamente tratado com 0,7 mA.

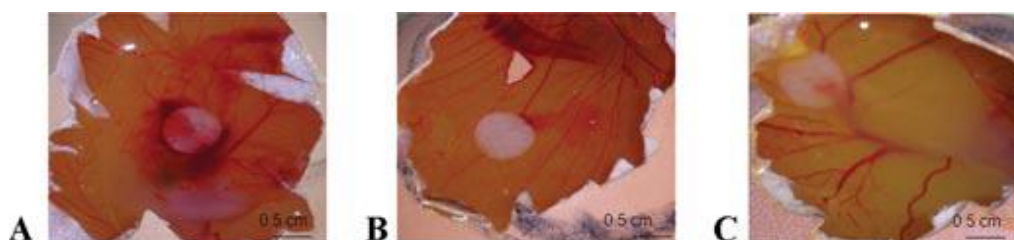


Figura 23: Efeito da dose hemorrágica de veneno de *C. atrox* em ovos de galinha fertilizados A) 20 µg de veneno B) 20 µg de veneno tratado com 0,7 mA C) Controlo (adaptado de Calzia *et al*, 2011).

De seguida foram incubados a 37°C, tendo sido visualizadas coroas às 2h e às 4h de período de incubação, tendo chegado à conclusão que ao aplicar previamente uma corrente eléctrica no agente hemolítico, a actividade hemolítica diminui.

2.5 Espectrofotometria de Absorção

Princípio do Método

A principal medida utilizada para analisar a actividade hemolítica é a absorvância, ou seja, a quantidade de fotões que é absorvida. De entre os artigos analisados, este método foi utilizado em 31 dos casos para o estudo da actividade hemolítica, representando 86% dos mesmos.

O método a seguir descrito utilizou a ruptura da célula e a respectiva libertação de hemoglobina no sobrenadante como parâmetro para a analisar a existência de actividade hemolítica *in vitro*.

A espectrofotometria de absorção é uma análise quantitativa que é utilizada em diversas áreas, tais como na bioquímica, física, química, materiais e em diversas aplicações industriais e clínicas. A sua utilização é tão vasta devido à relação entre o benefício e o custo, em que o custo do equipamento é de cerca de 2 a 7 mil euros. No caso por exemplo de aplicações clínicas, é usada para examinar o sangue ou tecidos para o diagnóstico clínico, tendo como principal objectivo medir a luz que é absorvida por uma amostra, sendo que neste caso foi medida a luz que era absorvida pela hemoglobina (UCDavis Chemwiki, 2014).

Um espectrofotómetro é constituído por um espectrómetro e um fotómetro. O espectrómetro emite um feixe de luz que pode ser de qualquer comprimento de onda / cor. Este feixe vai passar por uma cuvete onde se encontra a amostra, sendo a intensidade da luz que consegue passar através da amostra medida pelo fotómetro/detector que fornece um sinal de tensão para um galvanómetro (Caprette, 2012), como se pode observar na figura 24.

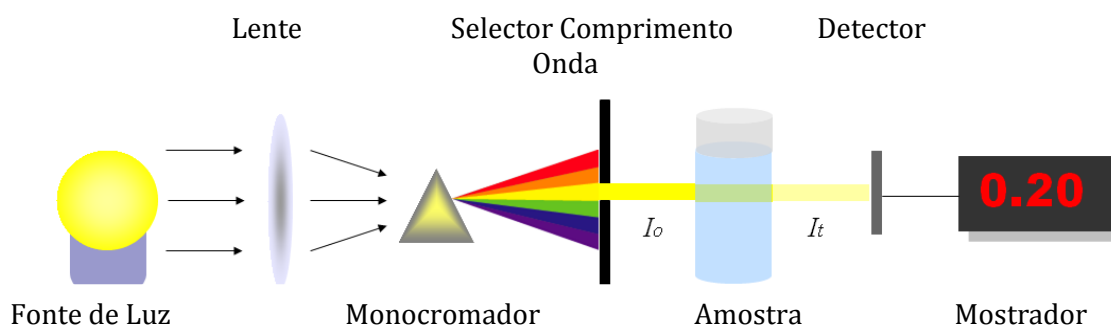


Figura 24: Esquema teórico da espectrofotometria de absorção (adaptado de UCDavis Chemwiki, 2014)

Esta técnica considera que cada composto transmite luz ao longo de um determinado intervalo de comprimento de onda. O ultravioleta utiliza geralmente as faixas entre 185-400 nm e o visível 400-700 nm. No caso de usar a faixa 700-1500 seria o infravermelho (UCDavis Chemwiki, 2014).

A hemoglobina apresenta uma cor vermelha porque absorve raios de luz azuis e verdes, sendo muito mais eficaz que o vermelho. O grau de absorvância destas luzes será proporcional à concentração de hemoglobina presente na amostra (Caprette, 2012).

A quantidade de luz que é captada pelo detector e que passa através da amostra depende do comprimento da cuvete e a concentração da mesma, sendo esta a I_t na figura 25. Na mesma imagem, o I_0 é a intensidade de luz antes da amostra. Nesse sentido, a absorvância vai ser calculada de acordo com a seguinte expressão, onde $\frac{I_t}{I_0}$ representa a transmitância.

$$\text{Absorvância (A)} = -\log\left(\frac{I_t}{I_0}\right)$$

O espectrofotómetro UV-Visível tem um limite de detecção entre 10 a 100 milimoles, consoante o coeficiente de extinção da molécula em causa, e apresenta exactidão de 1 a 3%, em relação ao padrão (Skoog & West, 1980).

Execução do Ensaio Hemolítico

De acordo com os artigos analisados existiram ligeiras alterações em relação à preparação da amostra, nomeadamente em relação ao tampão fosfato utilizado, ao tipo de eritrócitos analisado (humano, galinha, coelho, etc.) ou tempo de incubação. No entanto, os passos eram maioritariamente semelhantes entre os estudos analisados.

Os primeiros passos consistiram em preparar os eritrócitos que iriam ser analisados, diluindo-se com tampão fosfato com um pH 7,4 (Antunes *et al*, 2011) ou 8,5 (Hisamatsu *et al*, 2013), como se pode visualizar o esquema da figura 25. De seguida, esta amostra foi incubada durante trinta minutos (Seker, 2010) ou dezoito horas (Trpkovic *et al.*, 2010).

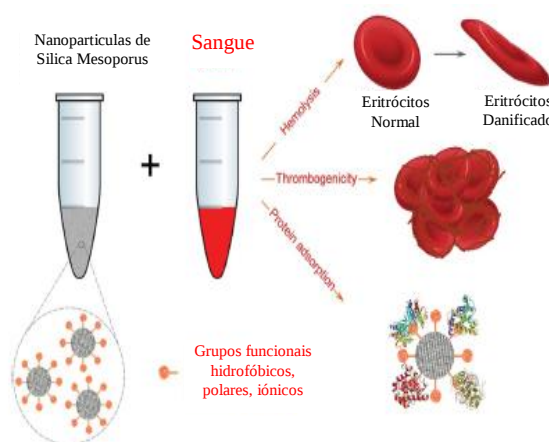


Figura 25: Esquema representativo da interacção dos diversos componentes do sangue e as nanopartículas de sílica. (adaptado de Yildirim *et al*, 2013)

O terceiro passo consistia em centrifugar a amostra entre três (Trpkovic *et al.*, 2010) a cinco (Sasaki & *al.*, 2010) minutos a diferentes rotações por minuto.

De seguida, a absorvância iria ser medida, podendo o comprimento de onda variar entre 414 (Fan *et al*, 2013) e 576 nm (Ng *et al*, 2014).

Foram 6 estudos que utilizaram o comprimento de onda 414 nm; dois deles estudavam o veneno da medusa *Cyanea noakii* em eritrócitos de galinha. Outros 2 artigos estudavam a micro emulsão de óleo/água com mitomicina, sendo que um utilizava eritrócitos humanos e o outro de ovelha. Um quinto estudava uma alga microscópica marinha e o sexto um protista pertencente ao plâncton marinho. A escolha deste comprimento de onda pode indicar a opção destes autores pela hemoglobina glicosilada

Os comprimentos de onda entre o 540 nm e 576 nm, relacionados com a oxihemoglobina, foram utilizados em 23 estudos que analisavam a actividade hemolítica de agentes hemolíticos muito díspares e em diferentes tipos de eritrócitos. Tal como foi abordado no tópico da hemoglobina, verificou-se que o valor onde existia maior absorção de luz por parte de a hemoglobina era entre os comprimentos de onda de 540 nm e 576 nm, motivo pelo qual foram estes os comprimentos de onda utilizados para medir a absorvância.

De entre os estudos analisados, existiam diversas perspectivas de análise à actividade hemolítica. De acordo com Trpkovic *et al.* (2010), a actividade hemolítica foi determinada pelo quociente entre a diferença entre a absorvância da amostra menos absorvância do controle negativo menos a absorvância dos eritrócitos com o tampão fosfato e a absorvância do controle positivo.

$$AH = \frac{\text{Abs. Amostra} - \text{Abs. Cont. Neg.} - \text{Abs. com Eritrócitos PBS}}{\text{Abs. Cont. Pos.}}$$

Lin & Haynes (2010) consideraram outra equação que também analisava a percentagem de hemólise. Considerava-se o quociente entre a diferença entre a absorvância da amostra e o controlo negativo, sendo o denominador a diferença entre a absorvância do controlo positivo e negativo.

$$AH = \frac{\text{Abs. Amostra} - \text{Abs. Cont. Neg.}}{\text{Abs. Cont. Pos.} - \text{Abs. Cont. Neg.}} \times 100$$

Caso o valor da equação fosse positivo, iria ser considerado que o agente apresenta actividade hemolítica. Caso o valor fosse negativo considerar-se-ia que a mesma não existia.

Nalguns casos foi analisada a quantidade de agente hemolítico que iria causar cinquenta por cento da lise dos eritrócitos (CH50) (Feng *et al.*, 2010).

O valor de HD₅₀ significava o valor de metade da dose que iria provocar a lise de um determinado volume de eritrócitos que se encontravam sensibilizados num volume total de glóbulos vermelhos. Esta preparação foi incubada durante determinado tempo a determinada temperatura (De-Qiang *et al.*, 2011).

No caso do artigo de De-Qiang *et al* (2011), a amostra foi incubada a 37°C durante duas horas. A figura 26 mostra a curva padrão do conteúdo do grau de hemólise provocado pela concentração da saponina.

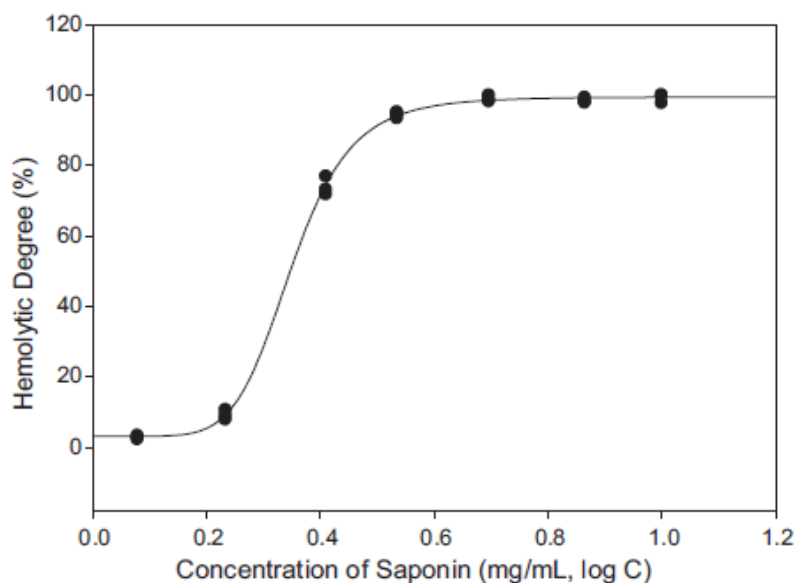


Figura 26: Curva padrão da saponina (De-Qiang *et al.*, 2011)

2.6 Microscópia de Força Atômica

Princípio do Método

A microscópia de força atômica é um instrumento importante para a medição, manipulação e imagem de matérias em termos de dimensões nanométricas. Fornece uma imagem topográfica tridimensional da superfície que está a analisar, tal como se pode ver na figura 27.

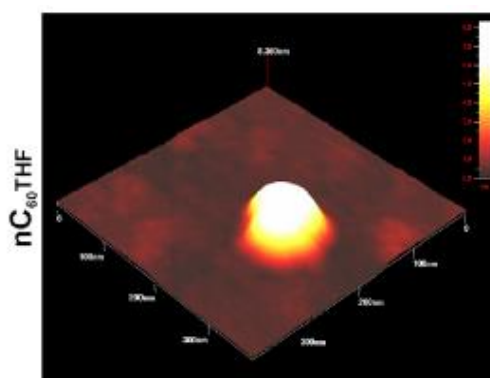


Figura 27: Representação do fulereno-THF através de microscopia de força atómica (Trpkovic *et al*, 2010)

O microscópio tem uma ponta delgada, como se pode ver na figura 28, que pode ser em diamante ou silicone que tem como objectivo realizar uma varredura na superfície em análise em diversas direcções x, y e z, conseguindo atingir uma resolução de fracções de nanómetros. Essa leitura vai ser realizada linearmente, sendo gravada a interacção que existe entre a ponta delgada e a amostra (The Tartan, 2010; Imaging Technology Group, 2007).

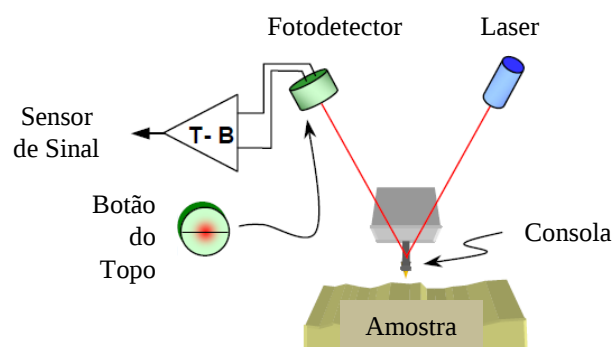


Figura 28: Princípio de funcionamento do sensor de sinal gerado pela microscopia de força atómica (adaptado de Ambios Technology Corporation, 2007)

A microscopia de força atómica é composta por vários constituintes, sendo eles um braço de suporte para realizar a leitura, um scanner, um detector e um controlador de erros. O microscópio como um todo pode ser observado na figura 29. O scanner é feito a partir de um tubo de elementos piezoeléctricos (materiais que mudam de forma quando uma certa quantidade de tensão é aplicada aos mesmos). A análise vai consistir

em disparar um feixe de laser do ponto do braço de suporte, sendo reflectida para um fotodetector sensível à posição (The Tartan, 2010).



Figura 29: Microscópio de força atômica (Nuance, 2014)

Quando a ponta da sonda se desloca próximo de uma superfície, as forças entre a ponta e a amostra podem ser repulsivas ou atractivas (sendo de grande distancia são maioritariamente atractivas devido a forças de Van der Waals). Quando existe contacto, essas interacções podem ser de fricção, de adesão, electromagnéticas ou magnéticas (Engineering IT Suport, 2013).

Existem 2 maneiras de realizar o scanning por microscopia de força atômica, uma por manter uma força constante e a outra por manter uma distância constante, pode ainda ser realizado um contacto, não contacto ou contacto intermitente.

Esta técnica pode ser utilizada com diversos tipos de amostras, tais como, líquidos, substâncias sólidas, condutoras, isolantes, magnéticas ou não, podendo ser utilizada em estudos de proteínas, péptidos, células, moléculas, tecidos ou ainda em novos biomateriais. Nesse sentido, pode ser aproveitada em diversas áreas como a física, nanotecnologia, química, biologia, engenharia de materiais e electrónica (The Tartan, 2010). Apesar de poder ser utilizada em tantas áreas, esta técnica não tem tanta utilização como a espectrofotometria, em parte devido ao custo deste equipamento que pode ser cerca de 26 mil euros.

O tamanho medição das partículas utilizando a microscopia de força atômica pode ir até 10 nm, com uma variação de cerca de 10% (NIST, 2009).

Execução do Ensaio Hemolítico

Com vista a analisar as alterações na morfologia dos eritrócitos provocada pelo fulereno, Trpkovic *et al* (2010) realizou uma análise com microscopia de força atômica. Numa primeira fase, a suspensão aquosa de fulereno foi dissolvida em THF. Após este tratamento durante 15, 30 e 60 min., 10 μ l de suspensão de eritrócitos foi pipetada sobre uma superfície de vidro e fixadas com metanol e secas ao ar.

De seguida, a amostra foi montada na plataforma XY do microscópio, tendo a câmara de vídeo sido fixada. O raio de curvatura da ponta de silício era inferior 10 nm e a frequência de oscilação foi de 136 kHz, tendo sido a taxa de varredura de 0,3-1 Hz e o intervalo de varredura do scanner de circuito fechado foi de 35 μ m.

Todas as imagens foram processadas com um software específico que as agrupa e nivela, apresentando-as em forma de onda, como se pode observar na figura 30.

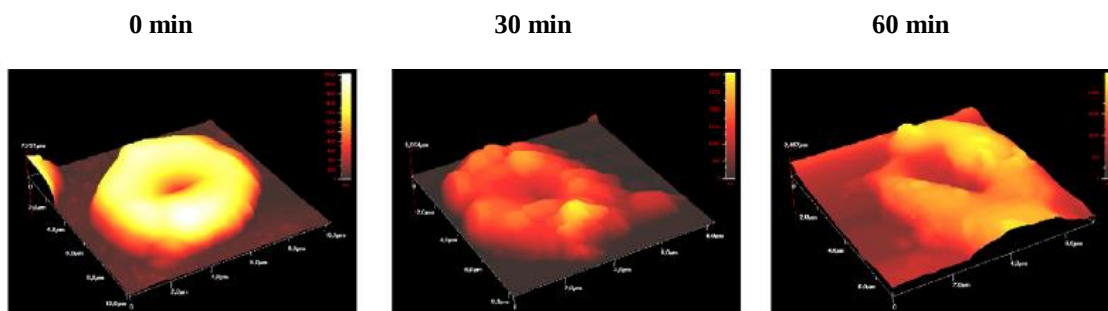


Figura 30: Eritrócitos incubados com 1 μ g mL⁻¹ nC_{60THF} durante 0 min, 30 min e 60 min (Trpkovic *et al*, 2010).

Como se observar na figura, com o evoluir do tempo os eritrócitos foram diminuindo a altura, diâmetro, passando a não se encontrar tão bem definidos como aos 0 min. Nesse sentido, foi calculado o valor quadrático médio da rugosidade de acordo com a fórmula:

$$R_{rms} = \sqrt{\left[\sum_{n=1}^N (z_n - z_{av})^2 \right]}$$

em que N representa o número total de pontos de dados numa área seleccionada, z_n é a altura do ponto em questão de um determinado ponto e z_{av} é a média da altura. A rugosidade foi calculada directamente através do software Quesant (Trpkovic *et al*, 2010).

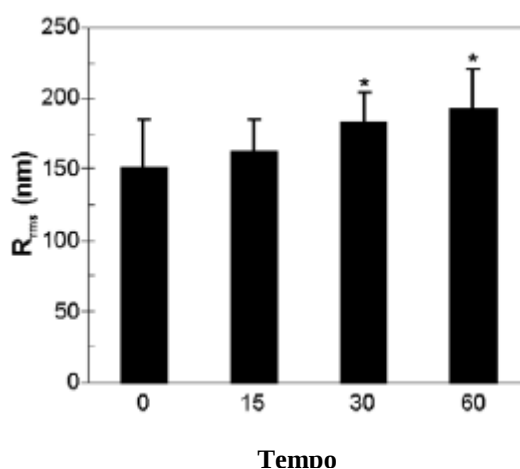


Figura 31: Rugosidade do eritrócito aos 0 min, 30 min e 60 min (Trpkovic *et al*, 2010).

Tal como se pode confirmar na figura 31, a rugosidade foi aumentando à medida que o tempo de contacto com o nC_{60} THF aumentava, causando assim dano ao eritrócito e sua membrana, podendo causar a longo termo hemólise.

2.7 Citometria de Fluxo

Princípio do Método

Esta técnica é utilizada em diversos campos, nomeadamente em imunologia, patologia molecular, biologia molecular, biologia, medicina nomeadamente na área dos transplantes, quimioterapia, genética, entre outros (Mandal, 2014). Apresentando uma condicionante que está relacionada com o elevado custo do equipamento que pode atingir até 500 mil euros, consoante os acessórios incorporados e a sua sensibilidade, embora seja possível adquirir um equipamento básico por cerca de encontrar-se entre 50 mil euros.

Na área da saúde, a citometria de fluxo é mais utilizada no estudo da viabilidade celular, imunofenotipagem, análise do ciclo celular, análise da proliferação celular, marcação intracelular, detecção da produção de citocinas, contagem CD4 em doentes com HIV, separação de células, entre outros (Romagnoli, 2013).

Citometria de fluxo, onde cito significava célula, metria significava medida e fluxo movimento. Nesse sentido, esta técnica teve como intuito separar, contar, examinar e classificar as partículas microscópicas que se encontram em meio líquido e em movimento. Esta permite uma análise rápida a diversos parâmetros da célula (Romagnoli, 2013).

Este método consistia em direccionar um feixe de luz às células que se encontravam em meio líquido e em movimento. Ao incidir este feixe de luz no fluxo de células, no instante que a célula passa diante do mesmo, provoca uma dispersão desse feixe que irá ser captada por diversos detectores. Esses detectores encontravam-se posicionados um na linha do feixe, sendo conhecido como dispersão *forward scatter* (FSC), os outros encontram-se posicionados perpendicularmente, sendo conhecido como dispersão *side scatter* (SSC). Existem ainda mais detectores fluorescentes (FL) com diversos canais (FL1, FL2, FL3 e FL4) como se pode ver na figura 32 (BD Biosciences, 2009).

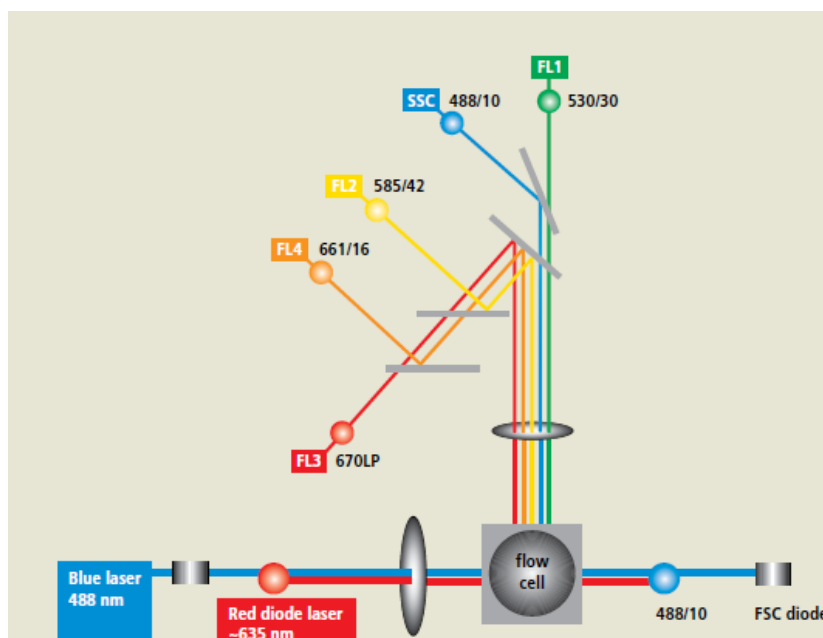


Figura 32: Feixes da citometria de fluxo que incidem sobre o fluxo de células (BD Biosciences, 2009).

O detector *forward scatter* tem como objectivo medir o tamanho relativo da célula, o *side scatter* analisava a granulidade ou complexidade da mesma. No global estes dois detectores conseguiram estudar a morfologia celular (Romagnoli, 2013).

Para viabilizar a análise que será feita, as células são marcadas com corantes fluorescentes que são excitados pelo laser e assim emitir luz a diferentes comprimentos de onda.

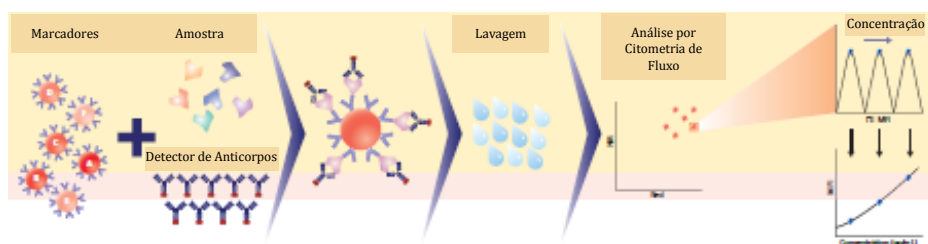


Figura 33: Marcação das células em citometria de fluxo (adaptado BD Biosciences, 2009).

A citometria de fluxo pode ser considerada como um conjunto de sistemas que numa primeira fase em relação aos fluídos introduz e alinha as partículas para análise. Posteriormente, irá gerar e recolher os sinais de luz, sendo de seguida convertidos em sinais electrónicos para serem analisados em sistema informáticos (Romagnoli, 2013).

A citometria de fluxo tem a capacidade de medir o tamanho de micro partículas. O facto de células serem marcadas com corantes fluorescentes permite atingir valores de detecção na ordem dos 0,3 a 1 μm (Robert, Lacroix, Poncelet, Harhour, Bouriche, Judicone... Dignat-George, 2012).

Execução do Ensaio Hemolítico

No estudo realizado por Trpkovic *et al* (2010), foram testadas diferentes suspensões aquosas de fulereno C_{60} previamente dissolvidas em THF, $n\text{C}_{60\text{THF}}$, para analisar a sua influência na produção intracelular de espécies reactivas de oxigénio em eritrócitos humanos.

A fase seguinte consistiu em adicionar solução salina tamponada com fosfato à suspensão de fulereno, 10 minutos antes de ser realizada a experiência.

Neste estudo foi utilizado o dihi-dromina como corante fluorescente que emite fluorescência verde para facilitar a análise.

A análise de citometria de fluxo teve como objectivo analisar as alterações que ocorreram no eritrócito após o tratamento com do fulereno com THF (Trpkovic *et al*, 2010).

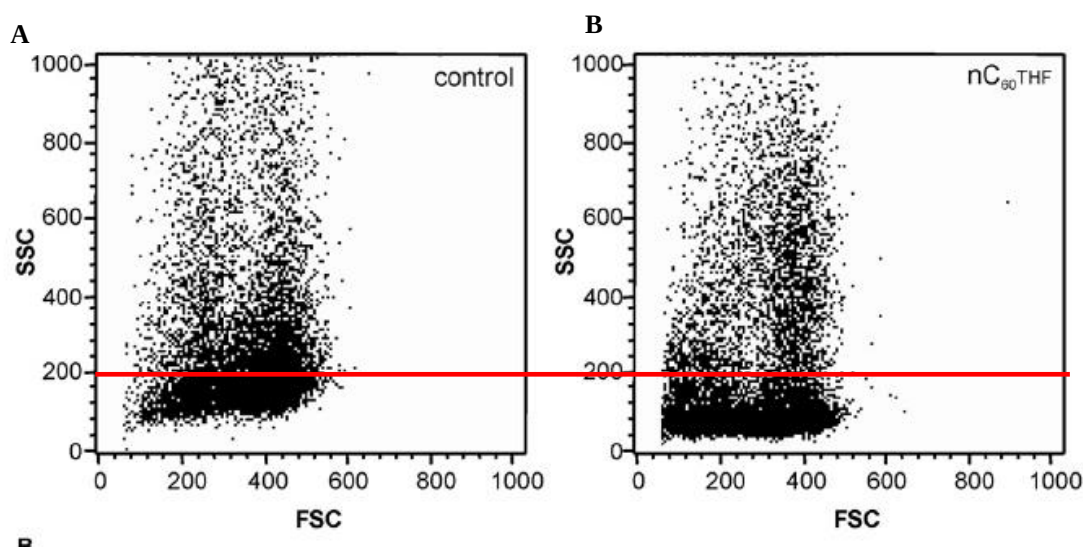


Figura 34: Citometria de fluxo eritrócitos de teste controle e nC₆₀THF passado 1h de incubação (adaptado de Trpkovic *et al*, 2010).

Esta análise foi realizada em 10.000 células por cada linha, tendo os eritrócitos sido avaliados através de dispersão frontal e lateral. Na figura 34 B foi adicionado aos eritrócitos 1 µg de nC₆₀THF e na figura 34 A o ensaio foi realizado sem adição de fulereno, ambos foram incubados durante 1h. De acordo com a análise das figuras, foi

possível afirmar que após 1h de contacto com nC₆₀THF, os valores de tamanho (FSC) e densidade (SSC) dos eritrócitos foram diminuídos.

3. ANÁLISE COMPARATIVA DOS MÉTODOS

No universo dos 36 artigos estudados, foram encontrados 8 métodos de determinação da actividade hemolítica.

Para a realização de análises *in vitro*, os métodos utilizados foram a espectrofotometria de absorção no visível, a citometria de fluxo, a microscopia de força atómica, a medição de halos de hemólise e a detecção visual da actividade hemolítica. Destes, o mais usado foi a espectrofotometria, 31 em 36, seguido da medição dos halos de hemólise, 3 em 36. Os restantes métodos foram referidos em apenas um dos artigos estudados.

Em relação aos ensaios *in vivo*, encontraram-se apenas 2 métodos, nomeadamente a medição dos halos hemorrágicos e a detecção visual da actividade hemorrágica, cada um referido em um artigo.

No que respeita à causa da hemólise, os trabalhos publicados abordaram um espectro alargado de agentes hemolíticos. No entanto, foi possível enquadrá-los em 4 tipos gerais, a saber: microorganismos, organismos marinhos, organismos terrestres e compostos sintéticos. A tabela 6 apresenta cada um dos agentes hemolíticos, segundo a classificação adoptada.

Tabela 6 Tipos de agentes hemolíticos do estudo realizado

Tipo de Agente	Agente Hemolítico em Estudo	Artigo
Microorganismos	<i>Acinetobacter baumannii</i>	(Antunes <i>et al</i> , 2011)
	<i>Candida</i> isolada à partir de leite de vacas com mastite	(Seker, 2010)
	Dinoflagelados protistas flagelados pertencem ao plâncton marinho (<i>Alexandrium peruvianum</i>)	(Tatters <i>et al</i> , 2012)
	Fungo <i>Candida</i>	(Rossoni <i>et al</i> , 2013); (Yigit <i>et al</i> , 2011);
	<i>Pasteurella multocida</i> B:2	(Chachra <i>et al</i> , 2011)
	Pneumolisina O intra e extra celular (<i>Streptococcus pneumoniae</i>)	(Arzanlou <i>et al</i> , 2011)
	Poros transmembranar do <i>Staphylococcus</i> -hemolisina	(Tomita <i>et al</i> , 2011)

Tipo de Agente (Cont.)	Agente Hemolítico em Estudo (Cont.)	Artigo (Cont.)
Organismos Marinhos	Alga microscópica marinha (<i>Heterosigma akashiwo</i>)	(Ling & Trick, 2010)
	Lectina do pepino marinho (<i>Cucumaria echinata</i>)	(Hisamatsu <i>et al</i> , 2013)
	Veneno medusa (<i>Cyanea nozakii</i>)	(Feng <i>et al</i> , 2010); (Li <i>et al</i> , 2011)
	<i>Vibrio harveyi</i> do camarão	(Rattanama <i>et al</i> , 2012)
Organismos Terrestres	Alga verde comestível presente em Mandapam (Índia) (<i>Ulva fascinata</i>)	(Priyadharshini <i>et al</i> , 2011)
	Cardiotoxinas serpente venenosa (<i>Naja naja</i>)	(Kao, Lin & Chang, 2010)
	Componentes oligoméricos e proteicos de fracções de IgG humano	(Min <i>et al</i> , 2014)
	Lectina da hemolinfa do soro do mosquito	(Sasaki <i>et al</i> , 2010)
	Saponinas provenientes de uma injeção herbal proveniente de medicina chinesa	(De-Qiang <i>et al</i> , 2011)
	Secreções da pele de sapo (<i>Kaloula pulchra</i>)	(Wei <i>et al</i> , 2013)
	Toxicidade das nanopartículas de pigmentos que ocorre naturalmente e faz parte de um componente activo do açafrão-da-Índia (<i>Curcumina</i>)	(Souza <i>et al</i> , 2013)
	Veneno escorpião (<i>Maurus</i>)	(Min <i>et al</i> , 2014)
	Veneno de cascavel diamante (<i>Crotalus atrox</i>)	(Calzia <i>et al</i> , 2011)
	Veneno serpente (<i>Alsophis portoricensis</i>)	(Weldon & MacKessy, 2012)
Compostos Sintéticos	Derivados da tiourea ($\text{SC}(\text{NH}_2)_2$)	(Singh <i>et al</i> , 2013)
	Dextrano de agmantina conjugado	(Yang <i>et al</i> , 2012)
	Fulereo	(Trpkovic <i>et al</i> , 2010)
	Guanilatos de polimetacrilatos	(Locock <i>et al</i> , 2013)
	Nanopartículas de sílica mesoporous	(Lin & Haynes, 2010); (Yildirim <i>et al</i> , 2013)
	Péptidos anticancerígenos	(Huang <i>et al</i> , 2011)
	Péptidos antimicrobianos α -helical	(Jiang <i>et al</i> , 2011)
	Peptido memb-activo com termodinâmica de junção a 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	(Spaller <i>et al</i> , 2013)
	Policarbonatos catiónicos biodegradáveis	(Ng <i>et al</i> , 2014)
	Surfactantes catiónicos derivados de lisina	(Colomer <i>et al</i> , 2011)
	Microemulsão de óleo/água com mitomicina	(Fan <i>et al</i> , 2013); (Kotmakchie <i>et al</i> , 2012)

Os agentes hemolíticos estudados nos 36 artigos foram maioritariamente compostos sintéticos, com 13 exemplos, seguidos de organismos terrestres, com 10, microorganismos, com 8, e organismos marinhos, com 5, como mostra a figura 35.

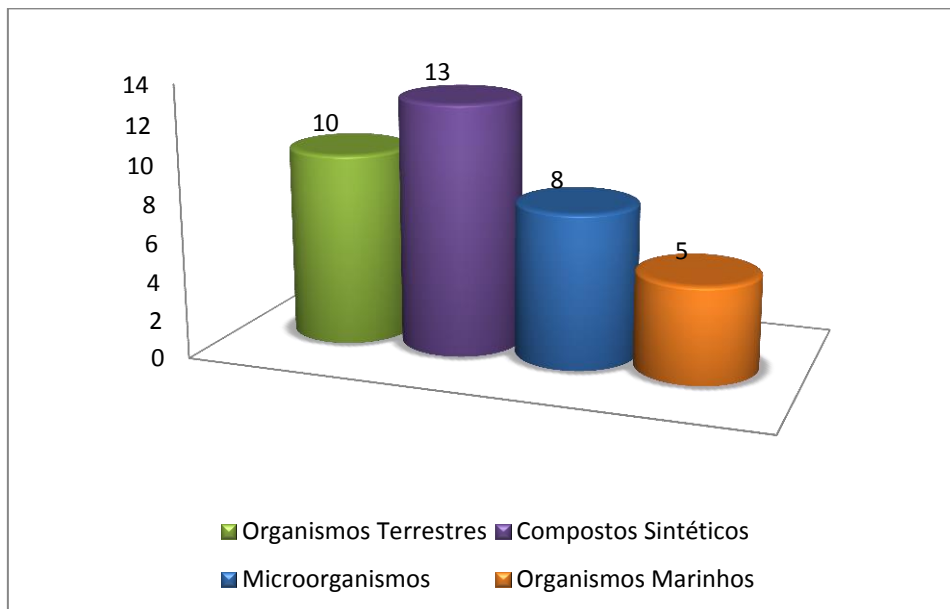


Figura 35: Esquema com os agentes hemolíticos estudados (dados da Tabela 6)

No que respeita à natureza do eritrócito-alvo, verificou-se alguma diversidade entre as amostras, havendo uma prevalência de mamíferos, 7 em 8. Nos ensaios analisados, a maioria dos eritrócitos utilizados para realizar a análise sobre a actividade hemolítica foram eritrócitos humanos, existindo inclusive casos em que se testaram especificamente os grupos sanguíneos A, B ou 0. A tabela 7 mostra todos os tipos de eritrócitos avaliados.

Tabela 7 Resumo dos tipos de eritrócitos do estudo realizado

Tipo de Eritrócitos	Origem	Artigo
Eritrócitos Humanos	Eritrócito humano tipo A	(Kao <i>et al</i> , 2010); (Sasaki <i>et al</i> , 2010)
	Eritrócito humano tipo O	(Arzanlou <i>et al</i> , 2011); (Kao <i>et al</i> , 2010)
	Eritrócito humano tipo B	(Kao <i>et al</i> , 2010)
	Eritrócito humano	(Colomer <i>et al</i> , 2011); (Huang <i>et al</i> , 2011); (Jiang <i>et al</i> , 2011); (Kotmakchiev <i>et al</i> , 2012); (Lin & Haynes, 2010); (Locock <i>et al</i> , 2013); (Louati <i>et al</i> , 2013); (Min <i>et al</i> , 2014); (Rossoni <i>et al</i> , 2013); (Singh <i>et al</i> , 2013); (Tatters <i>et al</i> , 2010); (Tomita <i>et al</i> , 2011); (Trpkovic <i>et al</i> , 2010); (Wei <i>et al</i> , 2013); (Yildirim <i>et al</i> , 2013)
Eritrócitos de Outros Mamíferos	Cabra	(Priyadharshini <i>et al</i> , 2011)
	Cavalo	(Antunes <i>et al</i> , 2011); (Chachra <i>et al</i> , 2011);
	Coelho	(De-Qiang <i>et al</i> , 2011); (Hisamatsu <i>et al</i> , 2013); (Ling <i>et al</i> , 2010); (Louati <i>et al</i> , 2013); (Min <i>et al</i> ,
	Gado	(Wei <i>et al</i> , 2013)
	Ovelha	(Antunes <i>et al</i> , 2011); (Fan <i>et al</i> , 2012); (Rattanama <i>et al</i> , 2012); (Seker, 2010); (Spaller <i>et al</i> , 2013); (Yigit <i>et al</i> , 2011)
	Rato	(Louati <i>et al</i> , 2013); (Min <i>et al</i> , 2014); (Ng <i>et al</i> , 2014); (Souza <i>et al</i> , 2013) ; (Tatters <i>et al</i> , 2010)
Eritrócitos de Não Mamíferos	Galinha	(Feng <i>et al</i> , 2010); (Li <i>et al</i> , 2011); (Min <i>et al</i> , 2014); (Priyadharshini <i>et al</i> , 2012); (Wei <i>et al</i> , 2013);

A figura 36 associa esquematicamente o tipo de eritrócito com o número de artigos encontrados. Os eritrócitos humanos foram utilizados em 18 (50%) dos artigos analisados. Em relação aos outros mamíferos, seguiram-se os glóbulos vermelhos de coelho, 8, e de ovelha, 6. Os eritrócitos de galinha foram estudados em 5 artigos.

Nos artigos onde não era indicado o tipo de eritrócito utilizado, Rossoni *et al*, 2013; Yigitet *al*, 2011; Seker, 2010, foi considerado o eritrócito que se enquadraria melhor na actividade do agente hemolítico e do contexto em estudo.

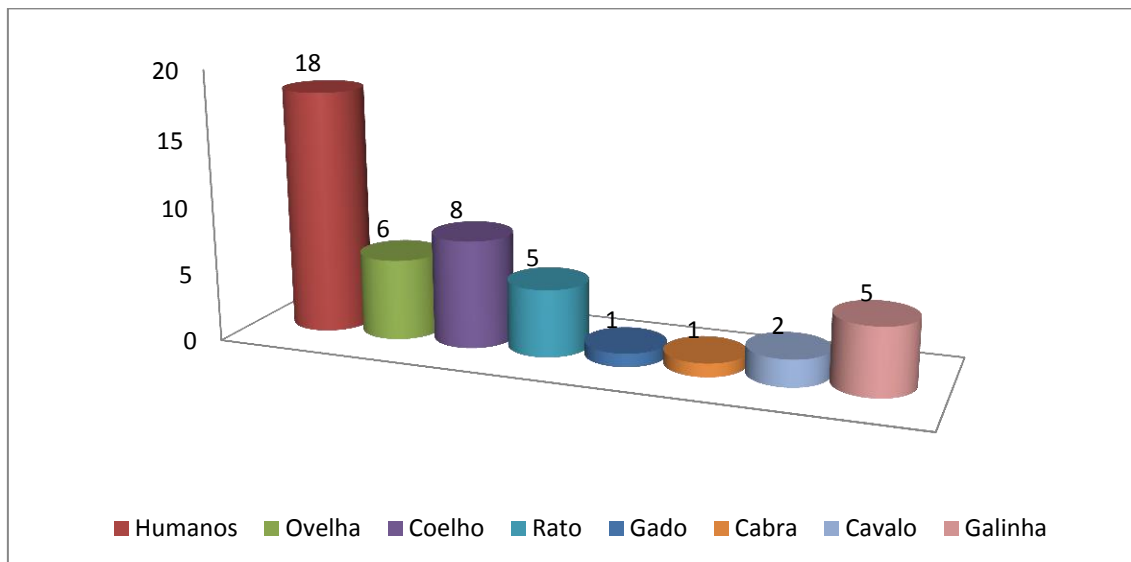


Figura 36: Número de ensaios realizados consoante o tipo de eritrócito (dados da Tabela 7)

Na continuidade da análise, verificou-se que o modo de acção dos agentes hemolíticos não é sempre o mesmo. Consoante o seu tamanho, o agente hemolítico poderá entrar com mais facilidade no interior do eritrócito e aí actuar ao nível do citoesqueleto, como é o caso do fulereno associado ao THF (Trpkovic *et al*, 2010). Se se tratar de macromoléculas, pode acontecer uma interacção com a membrana do eritrócito que leve à sua ruptura; tomando como exemplo a *C. albicans*, a acção hemolítica pode ocorrer na proteína banda 3 da membrana do eritrócito (Watanabe *et al*, 1999). Pode ainda ocorrer uma acção ao nível da membrana e do seu interior, como se constatou com a fenil-hidrazina (Hill & Thornalley, 1981; Shetlar & Hill, 1985).

Tendo em consideração os diversos métodos analisados, foi também possível concluir que a escolha do método para determinação da actividade hemolítica depende do tipo de análise que se pretende realizar.

Se o objectivo da análise fosse realizar um varrimento em muitas amostras simultaneamente, ou uma análise prévia a um estudo mais complexo, o método indicado seria o de detecção visual, quer *in vivo* ou *in vitro*.

Quando o pretendido era realizar uma análise quantitativa da intensidade da actividade hemolítica, o método preferencialmente utilizado foi a espectrofotometria de absorção, podendo ter sido utilizada em diferentes comprimentos de onda, como 414 nm, 540 nm ou 570 nm. Outro método quantitativo adoptado foi a medida dos halos formados pelos agentes hemolíticos.

No caso de se pretender uma análise mais detalhada sobre as alterações provocadas na morfologia do eritrócito, os métodos aconselhados seriam a microscopia de força atómica e a citometria de fluxo, os quais permitem desenvolver também uma análise quantitativa.

Existem ainda outras duas condicionantes importantes na selecção do método para um estudo da actividade hemolítica, sendo uma delas o tempo de execução do método, e posterior análise dos resultados, e a outra o factor económico, ou seja, o custo de realização do método.

Em relação ao tempo de execução, os métodos quantitativos de uma maneira geral são mais longos do que os qualitativos, em termos de preparação das amostras e execução dos procedimentos. Porém, no que toca à obtenção dos resultados, em geral, o tempo é inferior nos quantitativos.

No que concerne aos aspectos económicos, pode-se afirmar que a condicionante relacionada com a obtenção de amostras de eritrócitos e do agente hemolítico está presente em todos os métodos de determinação. No entanto, existem 2 que exigem que o laboratório onde é realizada a pesquisa tenha algum equipamento mais dispendioso não sendo habitual encontrar em todos os laboratórios, nomeadamente o microscópio de força atómica e a citometria de fluxo.

Finalmente, de acordo com os artigos estudados, foi possível afirmar que o método que utiliza a medição da absorvância é o mais abrangente de entre os métodos analisados, uma vez que consegue utilizar diversos tipos de agentes hemolíticos desde compostos sintéticos a organismos terrestres ou vegetais. Consegue também analisar diversos tipos de amostras e realizar uma análise quantitativa e de rápida leitura a baixo custo.

Bibliografia

- AboutEducation (2014). Osmosis – BloodCells disponível em <http://chemistry.about.com/od/imagesclipartstructures/ig/Science-Clipart/Osmosis-Blood-Cells.htm> em 26/10/2014.
- Adam (2009), Other complications from blood transfusions disponível em : <http://www.mybwmc.org/library/28/000210> em: 29/10/2014.
- Ambios Technology Corporation (2007). Operator's Manual Q-Scope 250/400 Nomad.
- Antunes, L. C. S., Imperi, F., Carattoli, A., & Visca, P. (2011). Deciphering the multifactorial nature of acinetobacter baumannii pathogenicity. *PLoS ONE*, 6(8), e22674. doi:10.1371/journal.pone.0022674
- Arzanlou, M., Bohlooli, S., Jannati, E., & Mirzanejad-Asl, H. (2011). Allicin from garlic neutralizes the hemolytic activity of intra-and extra-cellular pneumolysin O *in vitro*. *Toxicon*, 57(4), 540-545.
- BBL, (2012). BBL Sabouraud Dextrose Agar with Chloramphenicol disponível em [http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L007405\(08\)\(201202\).pdf](http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L007405(08)(201202).pdf) em 17/11/2014.
- BD Biosciences, 2009 disponível em https://www.bdbiosciences.com/documents/facscalibur_brochure.pdf em 20/11/2014.
- Bosi, S., Feruglio, L., Da Ros, T., Spalluto, G., Gregoretti, B., Terdoslavich, M., Decoti, G., Passamonti, S. & Prato, M. (2004). Hemolytic effects of water-soluble fullerene derivatives. *Journal of medicinal chemistry*, 47(27), 6711-6715.
- Calzia, D., Ravera, S., Aluigi, M. G., Falugi, C., Morelli, A., & Panfoli, I. (2011). Inactivation of Crotalus atrox venom hemorrhagic activity by direct current exposure using hens' egg assay. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 25(6), 377–381.

- Caprette, D. (2012) Principles of Spectrophotometry, disponível em <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/protein/spectrophotometer.html> em 17/11/2014.
- Chachra, D., Coote, J. G., Parton, R., & Jand, S. K. (2011). Haemolytic and cytotoxic activities of the Tween 80-extracted putative haemolysin of *Pasteurella multocida* B: 2. *Veterinary microbiology*, 150(3), 331-337.
- Chasis, J. A., & Mohandas, N. (1992). Red blood cell glycoporphins. *Blood*, 80(8), 1869-1879.
- Chemical Book, (2007) 99685-96-8(FULLERENE) Product Description disponível em http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_US_CB5308659.aspx em 18/11/2014.
- Ci, F. D. E., Farmac, N., & Ribeiro, U. D. E. (2007). Universidade de São Paulo.
- Ciência Hoje, 2014, disponível em <http://www.cienciahoje.pt/index.php?oid=48819&op=all> em 9/11/2014.
- Colomer, A., Pinazo, A., Manresa, M. A., Vinardell, M. P., Mitjans, M., Infante, M. R., & Pérez, L. (2011). Cationic surfactants derived from lysine: effects of their structure and charge type on antimicrobial and hemolytic activities. *Journal of medicinal chemistry*, 54(4), 989-1002.
- De-Qiang, D., Zheng, X., Guang, Y., Jian-Feng, Z., Ying-Kun, Q., Jing-Xian, Y., & Ting-Guo, K. (2011). Prediagnostic methods for the hemolysis of herbal medicine injection. *Journal of Ethnopharmacology*, 138(2), 445–450. doi:10.1016/j.jep.2011.09.035
- Diez-Silva, M., Dao, M., Han, J., Lim, C. T., & Suresh, S. (2010). Shape and biomechanical characteristics of human red blood cells in health and disease. *MRS bulletin*, 35(05), 382-388.
- Encyclopaedia Britannica, 2014. disponível em <http://www.britannica.com/> em 10/10/2014.

- Engineering IT Suport, 2013. Lecture 10: Basics of Atomic Force Microscopy disponível em http://www.eng.utah.edu/~lzang/images/Lecture_10_AFM.pdf em 16/11/2014.
- Fan, X., Yoshida, Y., Honda, S., Matsumoto, M., Sawada, Y., Hattori, M., Hisanaga, S., Hiwa, R., Nakamura, F., Tomomori, M., Miyagawa, S., Fujimaru, R., Yamada, H., Sawai, T., Ikeda, Y., Iwata, N., Uemura, O., Matsukuma, E., Aizawa, Y., Harada, H., Wada, H., Ishikawa, E., Ashida, A., Nangaku, M., Miyata, T., Fujimura, Y. & Fujimura, Y. (2013). Analysis of genetic and predisposing factors in Japanese patients with atypical hemolytic uremic syndrome. *Mol Immunol*, 54(2), 238–246. doi:10.1016/j.molimm.2012.12.006
- Feng, J., Yu, H., Xing, R., Liu, S., Wang, L., Cai, S., & Li, P. (2010). Partial characterization of the hemolytic activity of the nematocyst venom from the jellyfish *Cyanea nozakii* Kishinouye. *Toxicology in vitro*, 24(6), 1750-1756.
- Gomes, O., Biléu, M.C., Borges, L. (2013). Deficiência de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase – A Propósito de Um caso Clínico. *Revista de Saúde Amato Lusitano* 2013; 32:31-35.
- Grabowska, A. (2011), disponível em <http://en.bioinformatyk.eu/contest-articles/bioinformatic-tools-for-investigating-cas2-the-crispr-associated-protein.html> em 16/11/2014.
- GSI – Materials Research, 2014, Red Blood Deformability. Disponível em <http://www.ion-tracks.de/iontracktechnology/7/1/4.html> em 9/11/2014.
- Hill, H. A. O., & Thornalley, P. J. (1982). Free radical production during phenylhydrazine-induced hemolysis. *Canadian Journal of Chemistry*, 60(12), 1528-1531.
- Hisamatsu, K., Nagao, T., Unno, H., Goda, S., & Hatakeyama, T. (2013). Identification of the amino acid residues involved in the hemolytic activity of the *Cucumaria echinata* lectin CEL-III. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830(8), 4211–7. doi:10.1016/j.bbagen.2013.04.010

- Histology and Virtual Microscopy - Univesity of Michigan Medical School, 2010 disponível em <http://histology.med.umich.edu/medical-course-information-and-faculty-contacts> em 23/11/2014.
- Hoffbrand, V. & Moss, P. (2011). *Essential haematology*, 6th edition (Vol. 39). Wiley-Blackwell
- Hoffman, R., Benz Jr, E. J., Silberstein, L. E., Heslop, H., Weitz, J., & Anastasi, J. (Eds.). (2013). *Hematology: basic principles and practice*. Elsevier Health Sciences.
- Huang, Y. B., Wang, X. F., Wang, H. Y., Liu, Y., & Chen, Y. (2011). Studies on mechanism of action of anticancer peptides by modulation of hydrophobicity within a defined structural framework. *Molecular cancer therapeutics*, 10(3), 416-426.
- Hudnall, S.D. (2012) *Hematology: A Pathophysiologic Approach*, Elsevier Inc.
- Ibc Bioqímica, 2014 disponível em ibcbioquimica.blogspot.com em 20/10/2014.
- Imaging Technology Group, 2007, *Scanning Electron Microscopy Basics*, disponível em http://virtual.itg.uiuc.edu/training/AFM_tutorial/ em 16/11/2014.
- Institute of Biomedical Science, 2014, *The work and role of histologists* disponível em <https://www.ibms.org/go/biomedical-science/careers-jobs/careers-histology> em 23/11/2014.
- Jiang, Z., Vasil, A. I., Gera, L., Vasil, M. L., & Hodges, R. S. (2011). Rational Design of α -Helical Antimicrobial Peptides to Target Gram-negative Pathogens, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: Utilization of Charge, 'Specificity Determinants,' Total Hydrophobicity, Hydrophobe Type and Location as Design Parameters to Improve the Therapeutic Ratio. *Chemical biology & drug design*, 77(4), 225-240.
- Kantharaj, G.R., (2014), disponível em http://mol-biol4masters.masters.grkraj.org/html/Co_and_Post_Translational_Events4-Glycosylation_of_Proteins.htm em 31/10/2014.

- Kao, P. H., Lin, S. R., & Chang, L. S. (2010). Interaction of *Naja naja* atracardiotoxin 3 with H-trisaccharide modulates its hemolytic activity and membrane-damaging activity. *Toxicon*, 55(7), 1387-1395.
- Knowles Lab, Erythrocyte Membrane Cartoon, disponível em <http://dwknowles.lbl.gov/membrane/membrane.html> em 28/10/2014.
- Kotmakchiev, M., Kantarcı, G., Çetintaş, V. B., & Ertan, G. (2012). Cytotoxicity of a Novel Oil/Water Microemulsion System Loaded with Mitomycin-C in *In Vitro* Lung Cancer Models. *Drug Development Research*, 73(4), 185-195.
- Levitzky, M. G. (2010). *Fisiología pulmonar*. McGraw Hill Brasil.
- Lewis, S. M., Bain, B. J., Bates, I., & Dacie, J. V. (Eds.). (2002). *Dacie and Lewis practical haematology*. Elsevier Health Sciences
- Li, R., Yu, H., Feng, J., Xing, R., Liu, S., Wang, L., Qin, Y, Li, K, & Li, P. (2011). Two-step purification and in vitro characterization of a hemolysin from the venom of jellyfish *Cyanea nozakii* Kishinouye. *International journal of biological macromolecules*, 49(1), 14-19.
- Lichtman, M. A., Kipps, T. J., Seligsohn, U., Kaushansky, K., Prchal, J. T. (2010). *Williams Hematology*. 8th Edition, The McGraw-Hill Companies.
- Lin, Y. S., & Haynes, C. L. (2010). Impacts of mesoporous silica nanoparticle size, pore ordering, and pore integrity on hemolytic activity. *Journal of the American Chemical Society*, 132(13), 4834–4842.
- Ling, C., & Trick, C. G. (2010). Expression and standardized measurement of hemolytic activity in *Heterosigma akashiwo*. *Harmful Algae*, 9(5), 522–529. doi:10.1016/j.hal.2010.04.004
- Lintner, N. G., Kerou, M., Brumfield, S. K., Graham, S., Liu, H., Naismith, J. H., Sdano, M., Peng, N, She, Q, Copié, V, Young, M.J., White, M.F. & Lawrence, C. M. (2011). Structural and functional characterization of an archaeal clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)-associated complex for antiviral defense (CASCADE). *Journal of Biological Chemistry*, 286(24), 21643-21656.

- Liu, P., Zhu, Z., Zeng, C., & Nie, G. (2012). Specific absorption spectra of hemoglobin at different PO₂ levels: potential noninvasive method to detect PO₂ in tissues. *Journal of biomedical optics*, 17(12), 125002-125002.
- Locock, K. E., Michl, T. D., Valentin, J. D., Vasilev, K., Hayball, J. D., Qu, Y., Traven, A., Griesser, H. J., Meagher, L. & Haeussler, M. (2013). Guanylated polymethacrylates: a class of potent antimicrobial polymers with low hemolytic activity. *Biomacromolecules*, 14(11), 4021-4031.
- Luo, G., Samaranayake, L. P., & Yau, J. Y. (2001). Candida species exhibit differential in vitro hemolytic activities. *Journal of clinical microbiology*, 39(8), 2971-2974.
- Louati, H., Krayem, N., Fendri, A., Aissa, I., Sellami, M., Bezzine, S., & Gargouri, Y. (2013). A thermoactive secreted phospholipase A₂ purified from the venom glands of *Scorpio maurus*: Relation between the kinetic properties and the hemolytic activity. *Toxicon*, 72, 133-142.
- Madal, A, 2014 disponível em <http://www.news-medical.net/health/Flow-Cytometry-What-is-Flow-Cytometry.aspx> em 16/11/2014.
- Manns, J. M., Mosser, D. M., & Buckley, H. R. (1994). Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. *Infection and immunity*, 62(11), 5154-5156.
- McGraw-Hill Higher Education, 2000, disponível em <http://www.mhhe.com/biosci/genbio/maderinquiry9/student/olc/index.htm> em 26/10/2014
- Mebs, D., and C. L. Ownby. "Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities." *Pharmacology & therapeutics* 48.2 (1990): 223-236.
- Min, S., Yan, F., Zhang, Y., Ye, X., Zhong, M., Cao, J., Zou, H & Chen, J. (2014). Characterization of a Novel Hemolytic Activity of Human IgG Fractions Arising from Diversity in Protein and Oligosaccharide Components. *PloS one*, 9(1), e 85711.
- Moio, E., & Martins, A. (2012). Principais Compostos Químicos Presente nos Venenos de Cobras dos Gêneros *Bothrops* e *crotalus* – uma revisão, 02(1980), 21–26.

MSD, 2014, Manual Merck - Saúde para a Família disponível em http://mmspf.msdonline.com.br/pacientes/manual_merck/secao_14/cap_154.html em 9/11/2014.

National Institute of Standards and Technology, NIST (2009). Size Measurement of Nanoparticles Using Atomic Force Microscopy. NIST - NCL Joint Assay Protocol, PCC-6 Version 1.1. Disponível em http://ncl.cancer.gov/NCL_Method_PCC-6.pdf consultado em 25/11/2014

Ng, V. W. L., Tan, J. P. K., Leong, J., Voo, Z. X., Hedrick, J. L., & Yang, Y. Y. (2014). Antimicrobial polycarbonates: Investigating the impact of nitrogen-containing heterocycles as quaternizing agents. *Macromolecules*, 47(4), 1285–1291.

Nikon (2014). Disponível em <http://www.magersci.com/brochures/nikon/DS-Qi1.pdf> em 29/10/2014.

Nuance, Northwestern University's Atomic and Nanoscale Characterization Experimental Center , (2014) disponível em <http://www.nuance.northwestern.edu/spid/spid-instruments/bruker-bioscope-catalyst/index.html> em 19/11/2014.

Okamoto-Shibayama, K., Kikuchi, Y., Kokubu, E., Sato, Y., & Ishihara, K. (2014). Csa2, a member of the Rbt5 protein family, is involved in the utilization of iron from human hemoglobin during *Candida albicans* hyphal growth. *FEMS yeast research*, 14(4), 674-677.

Oregon Medical Laser Center (2014) Optical Absorption of Hemoglobin, disponível em <http://omlc.org/spectra/hemoglobin/>, consultado em 26/10/2014.

Pearson Education, 2004, <http://163.178.103.176/CasosBerne/4dCardiovascular/Caso26-2/HTMLC/CasosB2/Ulcera/Hema1.html>, consultado em 27/10/2014.

Poljičak-Milas, N., Kardum-Skelin, I., Vuđan, M., Silvija Marenjak, T., Ballarin-Perharić, A., & Milas, Z. (2009). Blood cell count analyses and erythrocyte morphometry in New Zealand white rabbits. *Veterinarski arhiv*, 79(6), 561-571.

Portal de Codificação dos GDH, 2002, disponível em http://portalcodgdh.min-saude.pt/index.php/1_-_Doen%C3%A7as_provocadas_por_agentes_qu%C3%ADmicos em 10/11/2014.

Priyadharshini, S., Bragadeeswaran, S., Prabhu, K., & Ran, S. S. (2011). Antimicrobial and hemolytic activity of seaweed extracts *Ulva fasciata* (Delile 1813) from Mandapam, Southeast coast of India. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(1), S38–S39. doi:10.1016/S2221-1691(11)60118-4

Rattanama, P., Thompson, J. R., Kongkerd, N., Srinitiwara Wong, K., Vuddhakul, V., & Mekalanos, J. J. (2012). Sigma E regulators control hemolytic activity and virulence in a shrimp pathogenic *Vibrio harveyi*. *PloS one*, 7(2), e32523.

Reagan, W. J. *Hematología veterinaria. Atlas de especies domésticas comunes*. Editado por Reagan, WJ, Sanders, TG, DeNicofa, DB Barcelona (España): Ediciones S, 1999. ISBN 978-84-87736-25-4.

Rice University, (2012). Organization of the Erythrocyte Membrane, disponível em <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/studies/sds-page/rbcmembrane.html>, em 22/10/2014.

Robert, S., Lacroix, R., Poncelet, P., Harhour, K., Bouriche, T., Judicone, C., Wischhusen, J., Arnaud, L. & Dignat-George, F. (2012). High-sensitivity flow cytometry provides access to standardized measurement of small-size microparticles—brief report. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 32(4), 1054-1058.

Rodak, B. F., Fritsma, G. A., & Doig, K. (2007). *Hematology: clinical principles and applications*. Elsevier Health Sciences.

Romagnoli, G.G., 2013 disponível em http://www.ibb.unesp.br/Home/Departamentos/MicrobiologiaeImunologia/citometria_de_fluxo.pdf em 20/11/2014.

- Rossoni, R. D., Barbosa, J. O., Vilela, S. F. G., Cardoso, A. O., & Junqueira, J. J. C. (2013). Comparison of the hemolytic activity between *C. albicans* and non-*albicans* *Candida* species. *Brazilian oral research*, 27(6), 484-489.
- Ryer, A., & Light, V. (1997). *Light measurement handbook*. Disponível em: http://irtel.uni-mannheim.de/lehre/seminar-psychophysik/artikel/Alex_Ryer_Light_Measurement_Handbook.pdf. Consultado em 25/11/2014
- Saladin, K.S. (2012). *Anatomy & Physiology*. 6th edition, McGraw-Hill Higher Education.
- Sasaki, T., Hiraoka, T., & Kobayashi, M. (2010). Hemolytic activity is mediated by the endogenous lectin in the mosquito hemolymph serum. *Journal of insect physiology*, 56(9), 1032-1039.
- Schaller, (2014) *Oxygen Binding & Reduction*, disponível em <http://employees.csbsju.edu/cschaller/Reactivity/oxygen/ORbinding.htm> em 26/10/2014.
- Seker, E. (2010). Identification of *Candida* species isolated from bovine mastitic milk and their in vitro hemolytic activity in western Turkey. *Mycopathologia*, 169(4), 303–308. doi:10.1007/s11046-009-9255-z.
- Shetlar, M. D., & Hill, H. A. (1985). Reactions of hemoglobin with phenylhydrazine: a review of selected aspects. *Environmental health perspectives*, 64, 265.
- Sigma-Aldrich, Hemoglobin (2014) *Heme Products & Erythrocytes*, disponível em <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/plasma-blood-protein/hemoglobin-heme-products.html>, consultado em 22/10/2014.
- Singh, D. P., Gangwar, M., Kumar, D., Nath, G., & Pratap, S. (2013). Synthesis, Spectroscopic Characterization, Crystal structure, Antimicrobial and In Vitro Hemolytic Studies of Some Novel Substituted Thiourea Derivatives. *Journal of Chemical Crystallography*, 43(11), 610-621.

- Skoog A. D. & West D. M. (1980) Principles of Instrumental Analysis. ISBN 10: 0030211611 ISBN 13: 9780030211614
- D'Souza, A. A., Jain, P., Galdhar, C. N., Samad, A., Degani, M. S., & Devarajan, P. V. (2013). Comparative In Silico–In Vivo Evaluation of ASGP-R Ligands for Hepatic Targeting of Curcumin Gantrez Nanoparticles. *The AAPS journal*, 15(3), 696-706.
- Spaller, B. L., Trieu, J. M., & Almeida, P. F. (2013). Hemolytic activity of membrane-active peptides correlates with the thermodynamics of binding to 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine bilayers. *The Journal of membrane biology*, 246(3), 257-262.
- Tatters, A. O., Van Wagoner, R. M., Wright, J. L., & Tomas, C. R. (2012). Regulation of spiroimine neurotoxins and hemolytic activity in laboratory cultures of the dinoflagellate *Alexandrium peruvianum*(Balech & Mendiola) Balech & Tangen. *Harmful Algae*, 19, 160-168.
- The Tartan, 2010. How Things Work: Atomic force microscopy, disponível em <http://thetartan.org/2010/4/26/scitech/htw> em 16/11/2014
- Thermo Scientific, 2014. Nunc™ Edge 96-Well Plate disponível em <http://www.thermoscientific.com/content/tfs/en/product/nunc-edge-96-well-plate.html?ca=edgeplate> em 29/11/2014.
- Tomita, N., Abe, K., Kamio, Y., & Ohta, M. (2011). Cluster-forming property correlated with hemolytic activity by staphylococcal γ -hemolysin transmembrane pores. *FEBS letters*, 585(21), 3452-3456.
- Tramer, F., Da Ros, T., & Passamonti, S. (2012). Screening of fullerene toxicity by hemolysis assay. In *Nanotoxicity* (pp. 203-217). Humana Press.
- Trpkovic, A., Todorovic-Markovic, B., Kleut, D., Misirkic, M., Janjetovic, K., Vucicevic, L., Pantovic, A., Jovanovic, S., Dramicanin, M., Markovic, Z & Trajkovic, V. (2010). Oxidative stress-mediated hemolytic activity of solvent exchange-prepared fullerene (C60) nanoparticles. *Nanotechnology*, 21(37), 375102. doi:10.1088/0957-4484/21/37/375102

- Trpkovic, A., Todorovic-Markovic, B., & Trajkovic, V. (2012). Toxicity of pristine versus functionalized fullerenes: mechanisms of cell damage and the role of oxidative stress. *Archives of toxicology*, 86(12), 1809-1827.
- UCDavis Chemwiki, 2014. Spectrophotometry disponível em http://chemwiki.ucdavis.edu/Physical_Chemistry/Kinetics/Reaction_Rates/Experimental_Determination_of_Kinetics/Spectrophotometry em 17/11/2014.
- University Politehnica Bucharest, 2010. Microscópio de Força Atômica disponível em <http://cmmip-upb.org/equipment/q-scope-350> em 16/11/2014.
- Vargas L.J., Londono M., Quintana J.C, Rua C., Segura C, Lomonte B, Nuñez V. (2012). An acidic phospholipase A with antibacterial activity from *Porthidium nasutum* snake venom. *Comp. Bioc. hem Physiol B Biochem Mol Biol* 161(4):341-7. doi: 10.1016/j.cbpb.2011.12.010
- Watanabe, T., Takano, M., Murakami, M., Tanaka, H., Matsuhisa, A., Nakao, N., ... & Matsumoto, T. (1999). Characterization of a haemolytic factor from *Candida albicans*. *Microbiology*, 145(3), 689-694.
- Wei, S., Chi, T., Meng, A., Chen, C., An, T., Wang, M., & Zhang, Y. (2013). Characteristics of hemolytic activity induced by skin secretions of the frog *Kaloula pulchra hainana*. *peptides*, 1, 4.
- Weldon, C. L., & MacKessy, S. P. (2012). Alsophinase, a new P-III metalloproteinase with ??-fibrinogenolytic and hemorrhagic activity from the venom of the rear-fanged Puerto Rican Racer *Alsophis portoricensis* (Serpentes: Dipsadidae). *Biochimie*, 94(5), 1189–1198. doi:10.1016/j.biochi.2012.02.006
- WHO, 2000, Concise International Chemical Assessment Document 19 - PHENYLHYDRAZINE disponível em <http://www.who.int/ipcs/publications/cicad/en/cicad19.pdf> em 20/11/2014.
- Yang, J., Liu, Y., Wang, H., Liu, L., Wang, W., Wang, C., Wang, Q, & Liu, W. (2012). The biocompatibility of fatty acid modified dextran-agmatine bioconjugate gene delivery vector. *Biomaterials*, 33(2), 604-613.

- Yenişehirli, G., Bulut, Y., & Tuncoglu, E. (2010). [Phospholipase, proteinase and hemolytic activities of *Candida albicans* isolates obtained from clinical specimens]. *Mikrobiyoloji bulteni*, 44(1), 71-77.
- Yigit, N., Aktas, E., Dagistan, S., & Ayyildiz, A. (2011). Investigating Biofilm Production, Coagulase and Hemolytic Activity in *Candida* Species Isolated From Denture Stomatitis Patients. *The Eurasian Journal of Medicine*, 43(1), 27–32. doi:10.5152/eajm.2011.06
- Yildirim, A., Ozgur, E., & Bayindir, M. (2013). Impact of mesoporous silica nanoparticle surface functionality on hemolytic activity, thrombogenicity and non-specific protein adsorption. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(14), 1909. doi:10.1039/c3tb20139b
- Zehnder L, Schulzki T, Goede JS, Hayes J, R. W. (2008). Erythrocyte storage in hypertonic (SAGM) or isotonic (PAGGSM) conservation medium: influence on cell properties. *Vox Sang*, 95 (4), 280–7.