

**ANA CRISTINA BORDÓN DE CORVALÁN**

**APLICAÇÃO DO MICROMÉTODO  
ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA A DETERMINAÇÃO  
DE AZUL DE EVANS EM PLASMA E TECIDO COLÔNICO  
DE RATOS WISTAR**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em  
Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da  
Universidade Federal do Paraná, como requisito  
parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Domingues Repka

**CURITIBA**

1994

**Orientador:**  
**Prof. Dr. João Carlos Domingues Repka**

*Ao meu pai, Enrique, pelo exemplo de honestidade e trabalho.*

*À minha mãe, Chela, pelo exemplo vivo de amor, fortaleza, valentia e coragem para enfrentar a vida.*

*Ao meu marido, Diego, por todo o amor, respeito, compreensão e por ter acreditado em nós.*

*Aos meus filhos, Silvia Cristina e Diego, por serem a razão da minha vida e fonte das mais profundas emoções.*

*O ponto que ontem era invisível,  
é hoje o ponto de chegada.  
Amanhã, será o de partida.*

***Macaulay***

*Um pedaço de mim ficou  
pálido e morno,  
não é desconforto  
não é dor  
não é carência  
é ausência do tempo que não vivi.*

*Um pedaço de mim prendeu-se  
num lugar sem hora, sem  
palavras,  
não é apego  
não é tristeza  
não é saudade  
é um tempo do tempo que vivi.*

*Um pedaço de mim tem memória,  
tem história.  
Não é velhice  
não é glória não é intenção  
é só um tempo de mim.*

**Marilia Becher Bahr**

## AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Osvaldo Malafaia**, pela oportunidade de crescimento profissional aliada ao apoio e confiança em mim depositadas, mesmo no início, desconhecida por todos. Dizer "*muchas gracias*" neste momento é reconhecer sua presença decisiva, seus conselhos claros e sábios, sua influência profunda e alteradora, reconhecendo perante todos, meu mais profundo respeito e admiração por quem despertou em mim, a inquietante curiosidade pelos caminhos da ciência, incentivando a luta contra a mediocridade e a pobreza de informação, que pode ser vencida ainda em nossos países do terceiro mundo.

Ao **Prof. Dr. Guillermo Agüero**, por ter aparecido no momento preciso, promovendo mudanças tão importantes na minha vida.

Ao **Prof. Dr. Benito Frutos**, pela confiança, apoio e por mostrar-me a importância do ensino e investigação.

Ao **Prof. Dr. João Carlos Domingues Repka**, pela paciente orientação dispensada durante a realização desta tese, pela amizade sincera, por haver transformado as horas do experimento em horas de tertúlia, de debate sobre aspectos da vida; um agradecimento profundo por ter possibilitado a recordação de experiências de luta, que não formando parte do cotidiano, marcaram a forma de enfrentar a vida.

Ao **Dr. Nemer Hajar**, por ter estado sempre presente, com a mão estendida para me ajudar e por me proporcionar oportunidades de prática cirúrgica. Meu agradecimento mais sincero pela amizade compartilhada e pela dedicação dispensada durante todo o período da realização desta tese.

À **Laila Hajar** pelo auxílio diligente na tradução deste trabalho e por ter me aceitado no seu lar com tanto carinho.

Ao **Prof. Dr. Ulrich Dietz**, pelo seu apoio concreto, suas diretrizes e pela amizade.

Ao **Prof. Dr. Nikolau Czczko** por ter me ensinado os passos para a elaboração de um projeto científico, ajudando-me a andar pelo caminho certo.

Ao **Dr. Luiz Fernando Kubrusly**, pela sua presença em momentos difíceis, sempre incentivando-me a continuar e pelo auxílio na tradução de documentos.

Ao **Prof. Dr. João Batista Marchesini**, pelo apoio aos meus projetos e orientação de meus trabalhos.

Ao **Dr. Wothan Tavares de Lima** por ter ensinado o método utilizado nesta tese, que hoje inicia uma linha de pesquisa.

Ao **Dr. Paulo César Andriguetto**, pela importante orientação à este trabalho, pela sua capacidade de evidenciar problemas e indicar soluções claras, pelas oportunidades de trabalho e amizade.

Ao **Dr. Luis Alberto Gonçalves Bueno**, pela amizade, apoio e oportunidades de compartilhar experiências profissionais.

A todos os amigos do Hospital Santa Cruz, por serem um grupo tão especial de pessoas.

À **Dra. Cristiane Kist Mousfi**, por ter aparecido num momento tão importante e inesquecível, oferecendo-me uma amizade sincera e eterna.

Aos amigos **Pablo Fabián Avilés Cabrera, Sylvania Klug Pimentel, Eduardo Pradi Adam e Sérgio Penteado** por formarem parte da equipe mais responsável de trabalho.

À **Celia Esther Cañete**, pela amizade, confiança, apoio humano que em nenhuma ocasião deixou de me oferecer e pelos tantos domingos compartilhados.

À **Marlei Benedita Ribeiro**, amiga especial, por ter brindado apoio sincero e companhia nos momentos difíceis.

Ao **Dr. Orlando Torres**, pelo auxílio na revisão deste trabalho e por ter compartilhado saudades na experiência difícil de viver longe da terra querida.

Ao **Prof. Dr. José Bellassai**, pela amizade e ajuda na realização de diferentes etapas desta tese.

À **UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCION**, pela concessão de uma bolsa de estudo, que bastante ajudou para enfrentar a dificuldade de viver num país estrangeiro.

À **CAPES**, pela concessão de uma bolsa de estudo, que possibilitou-me tomar a decisão de continuar com a linha de pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Roberto Da Silveira Moraes**, pela companhia durante todo o desenvolvimento do trabalho, com precisas orientações.

À **mami Chinchin**, sogra querida, que ainda não compartilhando das minhas decisões, me brindou sempre apoio incondicional.

Às minhas irmãs e cunhadas por ter cuidado com tanto amor dos meus filhos.

À **Venancia Jacquet**, pela tranquilidade que sua presença significou cuidando dos meus filhos.

À **Dra. Lilian Soto**, amiga querida, por estar sempre presente nos momentos mais difíceis da minha vida, pelo apoio, conselhos e pelo carinho que dá à meus filhos.

À todas as pessoas, que ajudaram escrever as páginas formais e informais desta tese, um fraterno abraço e meu sincero agradecimento.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	xii
LISTA DE FIGURAS .....	xiii
LISTA DE GRÁFICOS .....	xiv
LISTA DE QUADROS .....	xv
<b>RESUMO</b> .....	xvi
<b>ABSTRACT</b> .....	xvii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	5
<b>3 MATERIAL E MÉTODO</b> .....	16
3.1 AMOSTRA .....	17
3.1.1 Indução da anestesia .....	18
3.1.2 Pesagem dos animais .....	18
3.1.3 Inoculação do azul de Evans .....	18
3.1.4 Coleta de sangue .....	19
3.1.5 Coleta de fragmentos de cólon .....	20
3.2 SOLUÇÕES E REAGENTES .....	23
3.2.1 Solução do azul de Evans .....	23
3.2.2 Formamida .....	24
3.2.3 Solução de Hidrato de Cloral .....	25
3.3 MÉTODOS DE AFERIÇÃO .....	25
3.3.1 Dosagem do azul de Evans em tecido colônico por micrométodo espectrofotométrico em leitor de microplacas de ELISA .....	25
3.3.1.1 Preparo da solução padrão do azul de Evans .....	25
3.3.1.2 Leitura espectrofotométrica da solução padrão do azul de Evans .....	26

3.3.1.1 Leitura espectrofotométrica dos extratos de fragmentos de cólon em formamida.....	27
3.3.2 Dosagem do azul de Evans em plasma de ratos por micrométodo espectrofotométrico em leitor de microplacas de ELISA.....	28
3.3.2.1 Preparo da solução padrão do azul de Evans em plasma de ratos .....	29
3.3.2.2 Leitura espectrofotométrica da solução padrão do azul de Evans em plasma ..	29
3.3.2.3 Leitura espectrofotométrica de plasma de ratos inoculados com azul de Evans.....	29
3.3.3 Análise estatística .....	31
3.3.3.1 Determinação da regressão linear.....	31
3.3.3.2 Desvio padrão .....	31
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>32</b>
4.1 PESO DOS ANIMAIS.....	33
4.2 DOSE DO AZUL DE EVANS.....	33
4.3 PESO DAS AMOSTRA TECIDUAIS .....	34
4.4 VOLUME DE FORMAMIDA .....	35
4.5 SOLUÇÃO PADRÃO DO AZUL DE EVANS ( 25 mg/ml ) EM PLASMA.....	35
4.6 SOLUÇÃO PADRÃO DO AZUL DE EVANS ( 25 mg/ml ) EM SOLUÇÃO FISIOLÓGICA .....	37
4.7 SOLUÇÃO BRANCA.....	39
4.8 CONCENTRAÇÃO DO AZUL DE EVANS EM PLASMA .....	39
4.9 CONCENTRAÇÕES DO AZUL DE EVANS NO TECIDO COLÔNICO .....	41
4.10 RELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS E TECIDUAIS.....	43
4.11 CLAREAMENTO PLASMÁTICO DO AZUL DE EVANS.....	44
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>45</b>
5.1 MODELO ANIMAL.....	46

5.2 INOCULAÇÃO DO AZUL DE EVANS .....	47
5.3 OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS COLÔNICOS .....	47
5.4 PROCESSAMENTO DO MATERIAL .....	48
5.5 LEITURA ESPECTROFOTOMÉTRICA.....	49
5.6 SOLUÇÃO PADRÃO .....	50
5.7 SOLUÇÃO BRANCA.....	50
5.8 CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DO AZUL DE EVANS.....	51
5.9 CONCENTRAÇÕES TECIDUAIS DO AZUL DE EVANS.....	52
5.10 RELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS E TECIDUAIS .....	52
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>54</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>56</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{g}$  = micrograma

mg = miligrama

g = grama

kg = kilograma

$\mu\text{l}$  = microlitro

ml = mililitro

mm = milímetro

cm = centímetro

$^{\circ}\text{C}$  = graus Celsius

pH = potencial de hidrogênio

val. max. = valor máximo

val. med. = valor médio

val. min. = valor mínimo

nm = nanômetro

" = segundo

' = minuto

h = hora

d = dia

n = número

## LISTA DE FIGURAS

1	Inoculação do azul de Evans através da veia peniana no início do estudo .....	18
2	Aspecto azulado do rato após a inoculação do azul de Evans.....	19
3	Punção intracardíaca para obtenção de amostras sanguíneas .....	20
4	Demonstração do local de seção do reto na sua união com o ânus.....	21
5	Fragmento de cólon impregnado com azul de Evans .....	22
6	O fragmento de cólon situado na parte superior da figura corresponde a um animal não inoculado com azul de Evans, e na parte inferior, um fragmento de cólon de rato 8 h após a inoculação do corante.....	22
7	Adição de formamida ao tubo que contém o fragmento de cólon.....	23
8	Frascos de formamida e do azul de Evans .....	24
9	Placa de Terazaki utilizada para leitura espectrofotométrica.....	26
10	Leitor de microplacas BIO-TEK <sup>®</sup> , BT-100 .....	27
11	Tubos de ensaio contendo os extratos de formamida mais azul de Evans obtidos nos diferentes períodos de avaliação durante 16 dias ....	28
12	Tubos de ensaio contendo as amostras plasmáticas obtidas nos diferentes períodos de avaliação durante 16 dias .....	30

## LISTA DE GRÁFICOS

1	Distribuição gráfica e correlação (r) entre as concentrações do padrão do azul de Evans ( $\mu\text{g/ml}$ ) e densidades ópticas a 620 nm - Curva padrão de calibração para determinações plasmáticas.....	36
2	Distribuição gráfica e correlação (r) entre as concentrações do padrão do azul de Evans ( $\mu\text{g/ml}$ ) e densidades ópticas a 620 nm - Curva padrão de calibração para determinações teciduais.....	38
3	Demonstração gráfica das concentrações plasmáticas do azul de Evans obtidas nos diferentes períodos de avaliação durante 16 dias. Valores máximos, médios e mínimos em $\mu\text{g/ml}$ .....	40
4	Distribuição gráfica entre os valores máximos, médios e mínimos do azul de Evans em $\mu\text{g/g}$ de tecido colônico de ratos, por período de coletas.....	42
5	Demonstração gráfica da relação entre as concentrações do azul de Evans em plasma e tecido colônico encontradas nos diferentes períodos de avaliação.....	43
6	Demonstração gráfica dos valores médios das concentrações plasmáticas do azul de Evans e a relação percentual com a dose inicial inoculada.....	44

## LISTA DE QUADROS

I	Preparação das diluições da solução padrão do azul de Evans em solução fisiológica .....	25
II	Preparação das diluições da solução do azul de Evans em plasma de ratos.....	29
III	Peso dos animais em gramas registrados ao início do experimento .....	33
IV	Doses do azul de Evans ( ml ) inoculadas nos 96 animais ao início do experimento numa proporção de 20 mg/kg .....	34
V	Peso dos fragmentos colônicos em gramas, obtidos nos diferentes períodos de avaliação.....	34
VI	Volume de formamida colocado nos tubos de ensaio numa proporção de 4 ml por grama de fragmento de tecido colônico obtido nos diferentes períodos de avaliação.....	35
VII	Concentração do azul de Evans da solução padrão e densidade óptica a 620 nm em leitor de microplacas frente a plasma de ratos não inoculados .....	36
VIII	Relação entre concentração do azul de Evans da solução padrão e densidade óptica a 620 nm em leitor de microplaca frente a solução fisiológica como branco .....	37
IX	Valores obtidos do azul de Evans ( $\mu\text{g}$ de corante / ml de plasma ) e períodos de obtenção das amostras .....	39
X	Valores do azul de Evans em $\mu\text{g}$ de corante / grama de tecido e período de obtenção das amostras. Estes valores foram obtidos a partir das concentrações do corante presente no extrato de formamida.....	41

## RESUMO

O presente estudo objetiva standardizar um micrométodo para quantificar azul de Evans e possibilitar sua determinação em plasma e cólon de ratos para estabelecer o fluxo transcápicar normal do corante desde o compartimento vascular ao tecidual. Na primeira fase do estudo estabeleceu-se a calibração da solução padrão do azul de Evans a 2,5% diluída em diversas proporções em plasma de ratos e em solução fisiológica a 0,9 %, através da leitura espectrofotométrica em leitor de microplacas de ELISA. Obteve-se, as curvas padrões de calibração que permitiram a relação entre as densidades ópticas e as concentrações do corante. Para as determinações teciduais, utilizou-se solução fisiológica como branco e para as plasmáticas, plasma normal de ratos. Apresentaram respectivamente 0,98424 e 0,99539 como coeficiente de correlação (  $r$  ) para as calibrações. A outra fase do estudo consistiu na inoculação intravenosa, através da veia peniana, de 20 mg/kg do azul de Evans em 96 ratos Wistar, divididos segundo os períodos de avaliação, em 12 grupos de 8 animais cada. As avaliações plasmáticas e teciduais foram executadas durante o período de 16 dias, distribuídas a partir da inoculação do corante em: 15', 30', 60', 2 h, 4 h, 8 h, 16 h, 32 h, 2 d, 4 d, 8d e 16 d, com obtenção de amostras de plasma e fragmentos colônicos, sendo estes colocados em formamida, na proporção de 4 ml/g de tecido. Após a obtenção das densidades ópticas das amostras de plasma e cólon, foram interpolados os valores nas curvas padrões de calibração. Os valores obtidos demonstraram que o máximo de transferência do corante ao tecido colônico ocorre 8 horas após a inoculação com o valor médio de 148,3  $\mu\text{g/ml}$  de plasma e 48,32  $\mu\text{g/g}$  de tecido colônico. Os resultados obtidos permitiram concluir que foi possível standardizar o micrométodo espectrofotométrico que serviu para determinar as concentrações do azul de Evans em plasma e tecido colônico de ratos, após sua inoculação intravenosa.

## ABSTRACT

The aim of this study is to standardize a micro method to quantify Evans blue and to determine its presence in plasma and colon of rats, to establish the normal transvascular flux of the dye from the vascular compartment to the colonic tissue. As the first step of the procedure the micro method was standardized, through the calibration of the standard solution of 2,5% of Evans blue, diluted in different proportions with plasma and saline solution, in a micro plate reader of ELISA. The standard curves of calibration were obtained relating optical density and dye concentration. For the tissue determination, a saline solution was used as blank solution and for the plasma, normal rat plasma was used. The correlation coefficient of the calibrations were 0,98424 and 0,99539 respectively. The second step of the study was the intravenous injection through the penis vein of 20 mg/kg of Evans blue in 96 Wistar rats, divided in 12 groups of 8 rats each, according to the time of evaluation. The plasmatic and tissular evaluations were performed during a 16 day period, from the time of inoculation and every 15', 30', 60', 2 h, 4 h, 8 h, 16 h, 32 h, 2 d, 4 d, 8 d and 16 d, obtaining plasma samples and colonic fragments. The colonic fragments were preserved in formamide ( 4 ml/g ) for extraction of the dye. After the optical densities of plasmatic and colonic samples were obtained, the values were put on the standard calibration curve. The values obtained showed that the maximum transference of dye in the colonic tissue happened at the 8th hour post-inoculation with a mean value of 148,3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in plasma and 48,32  $\mu\text{g}/\text{g}$  in the colonic tissue. These results allowed to conclude that it was possible to standardize the spectrophotometric micro method, which permitted to determine the concentration of Evans blue in plasma and colonic tissue of Wistar rats, after intravenous injection.

# **1 INTRODUÇÃO**

## 1 INTRODUÇÃO

O corante azul de Evans, conhecido também como T-1824, é um sal orgânico, diazo-tetrassódico, com peso molecular de 960,8 utilizado em numerosas investigações clínicas, devido a sua inocuidade e alta afinidade pela albumina plasmática <sup>31,19, 10</sup>

Vários estudos clínicos e experimentais, evidenciaram sua utilidade na determinação do volume plasmático, ressaltando a vantagem sobre outros marcadores protéicos por não ser radioativo, ter alta solubilidade em água e ser mensurável através da espectrofotometria <sup>15, 27, 4, 18, 5, 29, 20</sup>

O azul de Evans foi aplicado em estudos de distribuição da albumina <sup>11, 10, 30</sup> e alteração da permeabilidade capilar, bem como em processos inflamatórios induzidos em animais, para caracterizar as respostas vasculares sob a ação de diferentes agentes químicos, físicos, mecânicos e farmacológicos <sup>19, 38, 40, 32, 22, 36, 33, 39, 41, 34, 14, 7, 1, 17, 28</sup>

Outros estudos evidenciam que o azul de Evans forma um complexo estável com as proteínas plasmáticas. Quando é injetado na circulação sanguínea em baixas concentrações, combina-se preferencialmente com a albumina, e quando esta concentração se eleva, a albumina plasmática é saturada e o corante passa também a ligar-se às globulinas plasmáticas, selecionando primeiramente as alfa globulinas. Após injetados 20 mg do azul de Evans intravenosamente em ratos de 200 g, não são encontradas quantidades mensuráveis do corante livre no sangue circulante <sup>37</sup>. O seu deslocamento da circulação é influenciado pela quantidade que as proteínas tissulares são capazes de fixar. O maior fluxo do azul de Evans plasmático é devido à transferência do corante das proteínas plasmáticas, para as proteínas tissulares <sup>19</sup>. Assim que o corante se desliga da albumina, retorna para a circulação por via linfática livre, recombina-se com proteínas ou dissipa-se pela via metabólica hepática, ou excreção, sendo encontradas quantidades mensuráveis nas fezes e nada na urina, em 24 horas <sup>4</sup>.

Os estudos clínicos e experimentais do fluxo transvascular após a inoculação intravenosa do azul de Evans, demonstram que a distribuição inicial do corante corresponde ao volume plasmático. O declínio durante as primeiras horas após a administração intravenosa é o resultado da soma da distribuição plasmática e da difusão para os tecidos através do fluxo transcapilar<sup>27, 14</sup>. A parede dos capilares e vênulas representam uma barreira entre os tecidos e o sangue. Esta barreira é permeável à água, eletrólitos e pequenas moléculas, sendo que o calor, traumas ou agentes químicos, como os próprios mediadores da inflamação e drogas, podem alterar a integridade e funcionalidade desta barreira, aumentando a permeabilidade aos elementos intravasculares. O termo permeabilidade capilar aumentada, refere-se à alteração dessa barreira que induz o aumento no ritmo de passagem das proteínas plasmáticas para o espaço intersticial, fenômeno conhecido como exsudação, característica fundamental nos processos inflamatórios. A exsudação está relacionada também a outros fenômenos vasculares como hiperemia e estase<sup>40</sup>. Como consequência da exsudação protéica, ocorre o edema, que pode ser medido pela quantificação do azul de Evans extravasado com as proteínas do compartimento sanguíneo ao intersticial. Fatores como, mediadores químicos da inflamação, injúrias com lesão vascular direta, fenômenos que aumentam o fluxo transcapilar e incrementam os níveis de acumulação do complexo corante-albumina nos tecidos, sendo então, útil a avaliação desses fenômenos, pela análise dos intercâmbios transcapilares em circunstâncias de permeabilidade microvascular alterada. A quantidade de albumina que flui normalmente para os tecidos não é significativa, mas o extravasamento é importante em vigência de alteração da permeabilidade capilar<sup>2</sup>.

Quanto do azul de Evans pode-se acumular num tecido refletindo o processo normal de transferência através do fluxo transcapilar?. Para responder esta pergunta precisa-se do estudo da cinética do azul de Evans através da determinação das concentrações do corante no compartimento vascular e das concentrações no tecido normal. No presente trabalho escolheu-se o tecido colônico para o estudo do fluxo transcapilar do azul de Evans, por ser de interesse para futuros estudos.

Os objetivos do presente trabalho são:

1- Estandardizar um micrométodo espectrofotométrico para determinar as concentrações em  $\mu\text{g}$  do azul de Evans;

2- Determinar o fluxo transcapilar do azul de Evans no tecido colônico, através das determinações plasmáticas e teciduais do corante.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

O azul de Evans é um corante vital, assim denominado por se combinar às proteínas plasmáticas. Essa propriedade tem sido muito explorada nos estudos de determinação do volume plasmático, desde as primeiras publicações de GREGERSEN, GIBSON e STEAD (1935), GIBSON e EVANS (1937)<sup>25</sup>.

Os primeiros estudos com o corante foram realizados em situações clínicas, para depois entrarem no campo da avaliação experimental. As discussões referentes ao emprego do corante, versavam em torno da problemática dos instrumentos para a medição da densidade óptica, assim como evitar as interferências colorimétricas de hemólise, lipemia, pigmentos biliares, turbidez e a cor inerente do plasma. Com o decorrer do tempo, ficou evidente a sua propriedade de combinar-se com as proteínas, colocando-o em lugar de importância dentro dos estudos de processos inflamatórios.

Foi desde os estudos de RAWSON em 1943, que as características da combinação albumina-corante começaram a ser demonstradas, através de estudos da afinidade de vários corantes vitais pelas proteínas. Em experimentos eletroforéticos, RAWSON demonstrou que o T-1824, azul celeste Niágara, azul celeste 6B e azul de tripan em plasma estavam totalmente combinados com a albumina quando presentes em baixas concentrações. O autor, demonstrou ainda que quando a concentração excedia certos limites, representando a capacidade de saturação da albumina, o corante se ligava às globulinas. As evidências indicaram que cada molécula de albumina pode combinar-se com um máximo de 14 moléculas de T-1824. Estudos de ultracentrifugação de albumina com corante também evidenciaram que o T-1824 se liga a proteína. Os testes de tintura do celofane revelaram diferenças das afinidades dos quatro corantes com a albumina, se bem que todos se combinavam com a albumina plasmática. O ritmo de desaparecimento da circulação encontrou-se inversamente proporcional a afinidade pela proteína. O autor demonstrou que o T-1824 apresentou maior afinidade com um ritmo de desaparecimento de

8 a 10% por hora e o azul celeste de Niagara apresentou a menor afinidade e o maior ritmo de desaparecimento de 54% por hora, concluindo que o T-1824 seria o melhor corante a ser utilizado para determinação do volume plasmático<sup>31</sup>.

Partindo dos conceitos até então vigentes da combinação seletiva do azul de Evans com a albumina e que o seu desaparecimento da circulação significava que igual quantidade de proteína desaparecia da circulação, LEVEEN em 1947, realizou estudo das taxas de desaparecimento do corante da circulação em humanos, durante o período de 24 horas. Os resultados demonstraram que a média de saída do corante da circulação era de 46%. Com este resultado o autor duvidou de que seja esta a porcentagem de regeneração protéica. Perguntou-se qual era a natureza química do complexo corante-proteína. Para respondê-lo realizou estudos químicos que demonstraram que a quantidade de corante em que a albumina poderia ligar-se, variava segundo o pH numa reação reversível. Nas condições de estudo com pH de 2,5 a quantidade de moléculas de corante por molécula de albumina era de 70:1. Em outra fase do experimento demonstrou que uma solução contendo albumina e corante na proporção de 7:29 e passando por uma resina que aceita somente íons livres, foi removido 50% do corante, concluindo-se que ocorreu dissociação do complexo albumina-corante e transferência deste para a resina. Esta seria a explicação do aparecimento do corante nos tecidos e secreções, além de explicar o mecanismo de desaparecimento do corante da circulação sem estar acompanhado da albumina<sup>19</sup>.

CASTER, SIMON e ARMSTRONG, em 1955, descreveram um método para a determinação do volume plasmático nos tecidos de ratos albinos que dependia da quantificação simultânea do azul de Evans em plasma e tecidos aos 5 minutos de inoculação intravenosa do corante. Foram obtidos as concentrações de azul de Evans nos diferentes tecidos, elaborando curvas de tempo-concentração. Observaram que as formas destas curvas eram diferentes para cada tecido. No cérebro e no músculo esquelético apresentavam uma fase rápida e outra que representaria o movimento lento do corante para os tecidos. Porém, no intestino delgado observaram uma fase lenta, bem como no intestino grosso,

pele, estômago e pulmão formando uma curva bifásica. A interpretação da forma da curva plasmática que seria a soma de todos os eventos em cada tecido pode ser separada em três fases: uma fase de rápido desaparecimento necessário para a distribuição de todo o corante no sistema vascular, com aproximadamente 11 ml de plasma. Outra fase de mistura, necessária para a distribuição do corante no leito capilar tecidual e por último a fase de transferência do corante que continua por várias horas e até dias, que diferem em ritmo para os diferentes tecidos. Às 24 horas de observação, após a injeção de 20 mg de azul de Evans somente 16% pôde ser encontrado no plasma, 30% na pele, 13% no músculo, 12% no fígado e 9% nos ossos, pouca quantidade, mas mensurável, foi encontrado nas fezes e nada na urina. O volume plasmático total resultou ser 16,3 ml para um rato de 338 g com 5,25 ml de plasma tecidual. Os autores concluíram que o método serviu para o cálculo do volume plasmático total <sup>4</sup>.

HUANG e BONDURANT em 1956, efetuaram a determinação de volume plasmático utilizando o azul de Evans e iodo radioativo para marcar a albumina em ratos Wistar-Purdue. A simultânea determinação do volume plasmático com o T-1824 e iodo radioativo foi de  $3,43 \pm 0,48$  ml/100 g com o primeiro e  $3,36 \pm 0,41$  ml/100 g com o segundo, sendo a porcentagem destas substâncias na primeira hora 15% a 30% da quantidade injetada. Os autores concluíram que não houve diferença significativa entre os volumes plasmáticos encontrados por ambos os métodos <sup>18</sup>.

A determinação do azul de Evans no sangue e nos tecidos, foi o objetivo de estudo realizado por CLAUSEN e LIFSON em 1956, que propuseram um novo processamento do tecido, que consistia na homogeneização em solução concentrada de uréia, desligamento do complexo corante-albumina, precipitação parcial do cromógeno com acetona e precipitação completa adicionando reagentes Somogy. O método foi utilizado para seguir a direção do corante após a injeção intravenosa de 12,5 mg de azul de Evans em ratos. Após 40 horas desta administração, observaram que 90% do corante injetado deixou a circulação, mas somente 15% não pôde ser recuperado do organismo. Vencidas as 140

horas de estudo, 67% do corante poderia ser recuperado do organismo. Os autores sugeriram que o método servia para quantificar o azul de Evans nos tecidos, após a inoculação intravenosa do corante <sup>5</sup>.

Foi descrito em 1962, por NIELSEN e NIELSEN, um cálculo para determinar a densidade branca do plasma numa longitude de onda de 620 nm, facilitando o cálculo da densidade do plasma corado com azul de Evans. As determinações das densidades brancas em plasma sem corante e sem hemólise visível a diferentes longitudes de onda tiveram uma evidente relação retilínea entre o logaritmo da longitude de onda e o logaritmo da densidade óptica. Os autores concluíram que essa simple equação, facilitaria as correções necessárias para calcular a densidade branca das amostras plasmáticas coradas com azul de Evans <sup>25</sup>.

Em 1966, STEELE e WILHELM, verificaram aumento da permeabilidade em eritemas induzidos pela aplicação de vários produtos químicos sobre a superfície da pele tricotomizada de cobaias. O aumento da permeabilidade foi indicada pela exsudação do azul de Evans circulante. A intensidade da coloração do líquido exsudado nos lugares de estudo, era estimado por comparação com um quadro de filtro de papel, preparado com gotas de corante com doses conhecidas. Tal intensidade era graduada comparativamente com o quadro, como por exemplo:  $\pm$ , +, +  $\pm$ , + + até + + + +, registrando com as equivalentes concentrações de azul de Evans. A ação de varios químicos sobre a pele, pôde ser avaliado com o uso do azul de Evans como marcador do líquido exsudado <sup>38</sup>.

UDAKA, TAKEUCHI e MOVAT, em 1970, quantificaram o aumento da permeabilidade capilar, em coelhos, ratos e cobaias albinas, que receberam azul de Evans por via intravenosa. Posteriormente foram induzidas várias lesões inflamatórias na pele. As peles lesadas foram removidas, cortadas e colocadas em formamida. A quantidade do corante extravasado dos tecidos pôde ser extraído com formamida e calculado quantitativamente por colorimetria. Os resultados demonstraram que o método serviu para

avaliar a permeabilidade vascular aumentada nas lesões inflamatórias induzidas por vários agentes químicos<sup>40</sup>.

Em 1971, REIS, OKINO e ROCHA e SILVA, utilizaram o azul de Evans para avaliar o efeito farmacológico da bradicinina e outras cininas relacionadas com permeabilidade vascular na parede abdominal de ratos. Injetaram intravenosamente 1 ml de solução de azul de Evans a 1%, em solução salina, como marcador do extravasamento plasmático, e intradermicamente 0,1 ml de cinina. A pele foi retirada e colocada em formamida, desta forma foi extraído o azul de Evans, possibilitando a leitura espectrofotométrica. A quantidade de azul de Evans foi calculada contra uma curva padrão do corante diluído em diferentes quantidades de formamida. Os resultados demonstraram aumento de permeabilidade vascular sob a ação da bradicinina pela constatação de níveis elevados do corante<sup>32</sup>.

Em 1980, BERNAUER utilizou o corante, não pela vantagem de sua afinidade com a proteína, mas sim pela sua capacidade de rápida difusão transcápilar em sua forma livre, onde o capilar e sua parede não são barreiras para ele. No experimento foram utilizados ratos Sprague-Dawley, nos quais foram induzidas lesões isquêmicas por ligadura de vasos coronarianos. Após o sacrifício o coração era retirado e a circulação coronariana irrigada com uma solução de azul de Evans, para colorir as partes não excluídas da circulação. Posteriormente o miocárdio era submetido a um método de extração do corante com ácido clorídrico, benzalcônio e clorofórmio. O clorofórmio azulado era lido espectrofotometricamente a 578 nm. Ao final da irrigação com o corante, as partes do miocárdio excluídas da circulação mantinham sua coloração normal, sendo que o restante ficava tingido de azul escuro. A solução de azul de Evans utilizada nesta forma, abandona os vasos rapidamente e se fixa nos tecidos. A parede vascular não é uma barreira em contraste ao que ocorre quando injetado na circulação venosa em um animal vivo; aí ele se liga às proteínas plasmáticas e o extravasamento do complexo corante-albumina, reflete a alteração da permeabilidade capilar. Concluíram que o método empregado para a

determinação da extensão do miocárdio excluído foi útil, dispensando pouco tempo e permitindo a comparação exata dos resultados entre diferentes animais <sup>2</sup>.

O fenômeno que se produz durante o estímulo nervoso em diferentes partes do organismo sobre toda a pele e vias aéreas superiores, tem sido tema de estudo para determinar a contribuição do mesmo na inflamação neurológica ( vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular ), participação dos mediadores envolvidos neste processo e a ação de drogas antagonistas. Em 1982, LUNDBERG e SARIA, estudaram o envolvimento dos neurônios sensoriais vagais no controle da permeabilidade vascular da mucosa da traquéia de ratos. Utilizaram uma dose de 20 mg/kg de azul de Evans intravenosamente, 5 minutos antes do estímulo vagal. Após a injeção, o animal era irrigado com solução fisiológica e então sacrificado. Um segmento de 1cm de traquéia era cortado, pesado e colocado em formamida. O azul de Evans extraído com a formamida era lido espectrofotometricamente. Animais de controle foram estudados com igual metodologia exceto os que não receberam estímulo vagal. O conteúdo de azul de Evans nos animais estimulados, que excedia o conteúdo presente nos animais de controle, era considerado como indicador do aumento da permeabilidade vascular. A estimulação elétrica nervo-vago, alterou a cor da traquéia de branco para azul intenso. Utilizando capsaicina substância inibidora, o extravasamento do azul de Evans como consequência do estímulo vagal foi abolido. Em 1983, os mesmos autores estudaram o efeito da fumaça do cigarro, irritação mecânica ( intubação traqueal ), irritação química ( éter, formalina, histamina, bradicinina, capsaicina ) e o estímulo vagal sobre a mucosa da traquéia e brônquios de ratos Sprague-Dawley, concluindo que esses estímulos induziram edema subepitelial indicado pelo extravasamento de azul de Evans. A fluoresceína foi empregada para a observação microscópica da distribuição do azul de Evans <sup>21</sup>.

Em 1983, GREEN e MARCHESSAULT, demonstraram a vantagem do uso do HPLC ( *high performance liquid chromatography* ), para a determinação do azul de Evans em amostras plasmáticas, sobre as técnicas convencionais de medição, através da alta

sensibilidade e acurácia do instrumento de alta resolução. Para este procedimento eram necessários amostras de pequeno volume, 150 µl de plasma, e posterior separação do complexo corante-albumina pela alcalinização do plasma em presença de excesso de magnésio <sup>13</sup>.

Em 1985, SZABO, BROWN e SCHNOOR, estudaram as lesões hemorrágicas na parede gástrica após a administração do etanol, utilizando como marcadores a tinta índia e o azul monastral, para evidenciar os danos vasculares, e o azul de Evans como indicador da permeabilidade vascular alterada. A instilação intragástrica de etanol à 75% e à 100% em ratos Sprague-Dawley, determinou o aumento da permeabilidade vascular nos primeiros 3 minutos, resultando na demarcação vascular em 13 à 17% . Um minuto após a administração intragástrica de 1 ml de etanol à 100% demonstrou a duplicação da concentração do azul de Evans nas glândulas do estômago. Nos ratos de controle a concentração do corante nas glândulas era duas a três vezes maiores que o conteúdo luminal. Após 12 minutos da ação do etanol a 75% e 100% as concentrações de azul de Evans no conteúdo gástrico e glandular foram comparáveis. Demonstrou-se a utilidade do azul de Evans para avaliar alterações inflamatórias na mucosa gástrica <sup>39</sup>.

Numerosos modelos de processo inflamatório em animais de experimentação, têm demonstrado a validade do uso de azul de Evans na determinação da permeabilidade capilar presente nestes processos. Em 1988 WOODS, SMITH e GRAHAM estudaram a acumulação intragástrica do azul de Evans em humanos como indicador de lesão aguda da mucosa produzida pela aspirina. Neste estudo foi utilizado o azul de Evans na dose de 50 mg/kg de peso dissolvidos em 50 ml de solução glicosada a 5% administrado por via endovenosa. Os níveis de azul de Evans no conteúdo gástrico e no plasma foram mensurados espectrofotometricamente. Foi evidenciado que o dano da mucosa gástrica produzido pela aspirina, poderia ser detectado medindo-se o conteúdo gástrico do azul de Evans após a administração da aspirina. Concluíram que a mensuração do azul de Evans no

conteúdo gástrico ofereceria índice precoce qualitativo e possivelmente quantitativo da injúria da mucosa gástrica <sup>41</sup>.

Em 1988 FLORES, MELO e FERREIRA, estudaram num modelo experimental de infarto de miocárdio em ratos Wistar, o emprego do azul de Evans como método para quantificar o dano miocárdico produzido, propondo a mensuração do extravasamento proteico como índice da extensão da área infartada. O azul de Evans foi injetado por via endovenosa 24 horas antes da oclusão coronariana. Após a indução do infarto, os animais foram sacrificados e os corações removidos. As áreas infartadas apresentavam um aumento progressivo da coloração azul, fenômeno este denominado de "infarto azul". A peça foi irrigada com solução de Ringer e colocada em formamida com posterior leitura espectrofotométrica do extrato. Os resultados das leituras evidenciaram aumento da concentração do corante, concluindo-se que servia para avaliar extensão da lesão induzida no miocárdio <sup>8</sup>.

GREEN, JOHNSON, MARCHESSAULT e GATTO, em 1988, avaliaram o fluxo transcapilar através da avaliação do conteúdo intravascular e tecidual, e a distribuição histológica do azul de Evans em cobaias normais e em cobaias submetidas ao aumento generalizado da permeabilidade microvascular pela ação sistêmica da histamina e endotoxina. O azul de Evans foi injetado por via endovenosa em cobaias anestesiadas, e as amostras plasmáticas foram obtidas em diferentes períodos de tempo. Os animais submetidos a ação da histamina e endotoxina, receberam a administração destas substâncias 1 hora antes da inoculação do azul de Evans. O corante foi extraído dos tecidos em formamida e o extrato lido espectrofotometricamente. O mesmo tipo de leitura foi usado para a determinação do corante nas amostras plasmáticas. Demonstraram que o declínio das concentrações plasmáticas era o resultado da acumulação do corante nos compartimentos teciduais. Observaram aceleração neste declínio após a utilização da endotoxina e histamina, drogas que produziram incremento generalizado da permeabilidade microvascular <sup>14</sup>.

FINCK, MASHBURN, KOTTKE e ORSZULAK em 1989, estudaram a permeabilidade vascular de enxertos venosos arterializados, qualitativamente com azul de Evans e quantitativamente com iodo<sup>125</sup> combinado com albumina. Utilizaram cães que haviam recebido o enxerto 24 horas antes do sacrifício. Os animais receberam azul de Evans e albumina marcada por via endovenosa. Em todos os cães a captação radioativa foi superior aos controles e também a permeabilidade vascular aumentada, qualitativamente confirmada com a observação da impregnação de maior intensidade do corante nos enxertos. Concluíram que este aumento poderia ser um fator determinante de arteriosclerose dos enxertos venosos <sup>7</sup>.

Em 1990, BACCARO, MARIANO e MALUCELLI, propuseram a existência de substâncias nos tecidos crônicamente inflamados que ativariam elementos plasmáticos aumentando a permeabilidade vascular e reativando o processo inflamatório. Para elucidar esta questão realizaram experimentos em ratos Wistar, produzindo lesões com nistatina e BCG injetando após, plasma não ativado e inibindo os fenômenos com anti-inflamatório não esteróides. As mudanças na permeabilidade vascular foram mensuradas pelos níveis de azul de Evans teciduais <sup>1</sup>.

Em 1991, CURTI, WIEZEL, LIMA, FERREIRA e RINCON, tentando explicar o mecanismo de tintura do miocárdio durante o infarto induzido em ratos realizaram estudo histopatológico do fenômeno chamado "infarto azul". O material para a observação do azul de Evans nos cortes histopatológicos, foi processado por congelação. Através dos estudos morfológicos concluíram que a coloração se produz por difusão do corante entre as células necróticas <sup>6</sup>.

Em 1992, HAAS, MACMILLAN, JORDAN e HU, utilizaram o azul de Evans para avaliar um modelo orofacial de inflamação aguda induzida pela ação óleo de mostarda. A mensuração do extravasamento do complexo corante-proteína demonstrou a indução da inflamação <sup>17</sup>.

O extravasamento microvascular é uma característica primária da inflamação induzida com antígenos que levam à exsudação plasmática nas vias aéreas. OBATA, KOBAYASHI, OKADA, NAKAGAWA, TERAWAKI e AISHITA em 1992, definiram a ação dos leucotrienos sobre o estreitamento brônquico e os vasos endoteliais. Ao inibirem leucotrienos, demonstraram diminuição do extravasamento protéico produzido pela ação agressora do antígeno sobre os vasos. Para a avaliação da exsudação plasmática por dano vascular, foi mensurada a concentração do azul de Evans nas vias aéreas e no pulmão. Evidenciou-se que quando presente uma lesão os níveis do azul de Evans aumentaram <sup>28</sup>.

### **3 MATERIAL E MÉTODO**

### 3 MATERIAL E MÉTODO

O presente estudo foi desenvolvido no laboratório de Imunologia e Microbiologia da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná.

Investigou-se no tecido colônico e plasma de ratos, o fluxo transcapilar do azul de Evans, entendendo-se isto como a saída do corante, previamente inoculado por via intravenosa, do compartimento central (ou vascular) ao periférico (ou tissular), e sua consequente acumulação tecidual. Com vistas a alcançar os objetivos propostos, o estudo foi desenvolvido seguindo etapas definidas.

Primeiramente definiu-se realizar o modelo experimental em ratos machos.

A seguir foram preparados os reativos a serem utilizados em todo o experimento, e padronizado o micrométodo espectrofotométrico para quantificar o azul de Evans nos níveis tissulares e plasmáticos em leitor para microplacas de ELISA. Finda esta fase, os animais foram identificados, pesados e separados em grupos para o experimento.

Os resultados obtidos foram submetidos a testes estatísticos (cálculo de coeficiente de correlação linear e o cálculo da média e desvio padrão).

Aplicaram-se as Normas para Apresentação de Trabalhos da Universidade Federal do Paraná (1992), a Nômina Anatômica Veterinária (1983) e os Princípios Éticos na Experimentação Animal do *International Council for Laboratory Animal Science* (1990).

#### 3.1 AMOSTRA

Foram utilizados 96 ratos albinos, machos ( *Rattus norvegicus*, *Rodentia mammalia* - linhagem Wistar-TECPAR ) divididos em 12 grupos, segundo o tempo de sacrifício, com 8 animais em cada grupo. Os ratos foram anestesiados, pesados e inoculados com a solução do azul de Evans.

Durante todo o experimento os animais receberam dieta NUVITAL<sup>®</sup>, padronizada para espécie e água *ad libitum*, permanecendo em temperatura ambiente.

### 3.1.1 Indução da anestesia

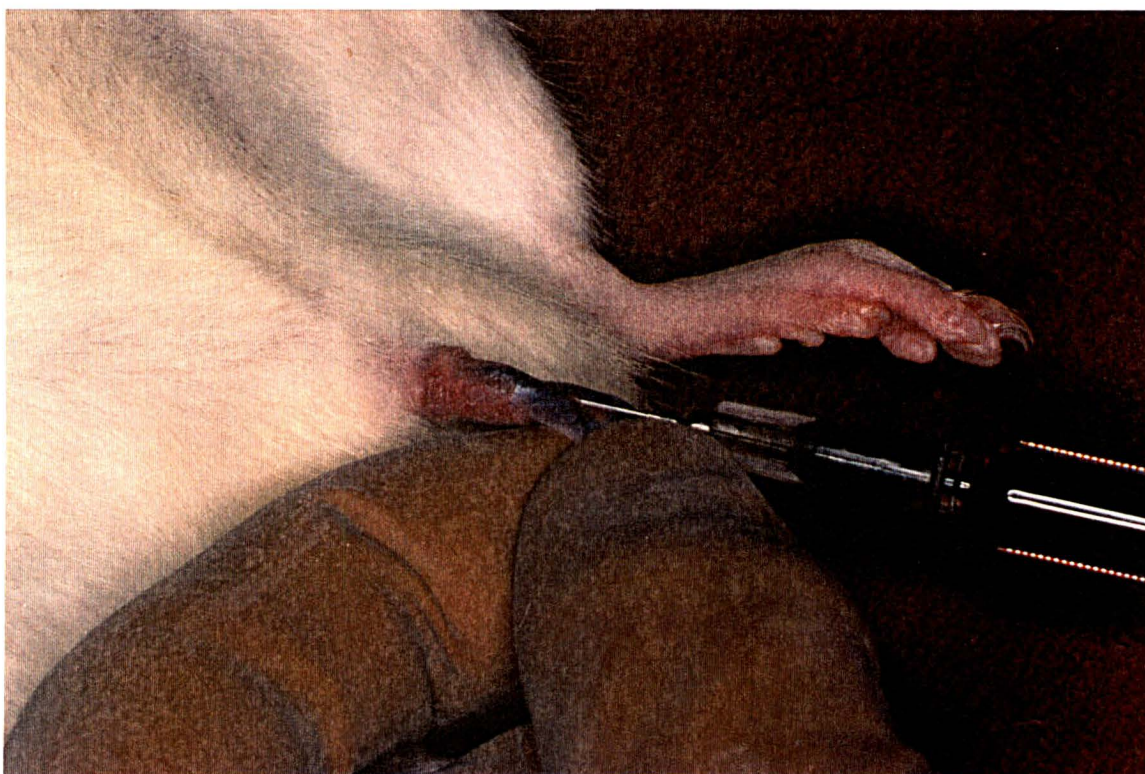
Os animais foram anestesiados com 0,5 ml a 1 ml de Hidrato de Cloral a 10% por via intraperitoneal.

### 3.1.2 Pesagem dos animais

Após anestesiados os ratos foram pesados em balança eletrônica HELMAC<sup>®</sup> HM 3300.

### 3.1.3 Inoculação do azul de Evans

A partir do peso dos animais foram calculados os inóculos da solução do azul de Evans a serem administrados na proporção de 20 mg / kg de peso corpóreo em cada animal. Foram utilizadas agulhas de 13 x 3,8 mm e seringas de 1 ml, tendo acesso ao sistema venoso pela veia peniana. Os animais foram marcados com ácido pícrico e separados em caixas com oito ratos cada.



**Figura 1.** Inoculação do azul de Evans através da veia peniana do rato no início do experimento.

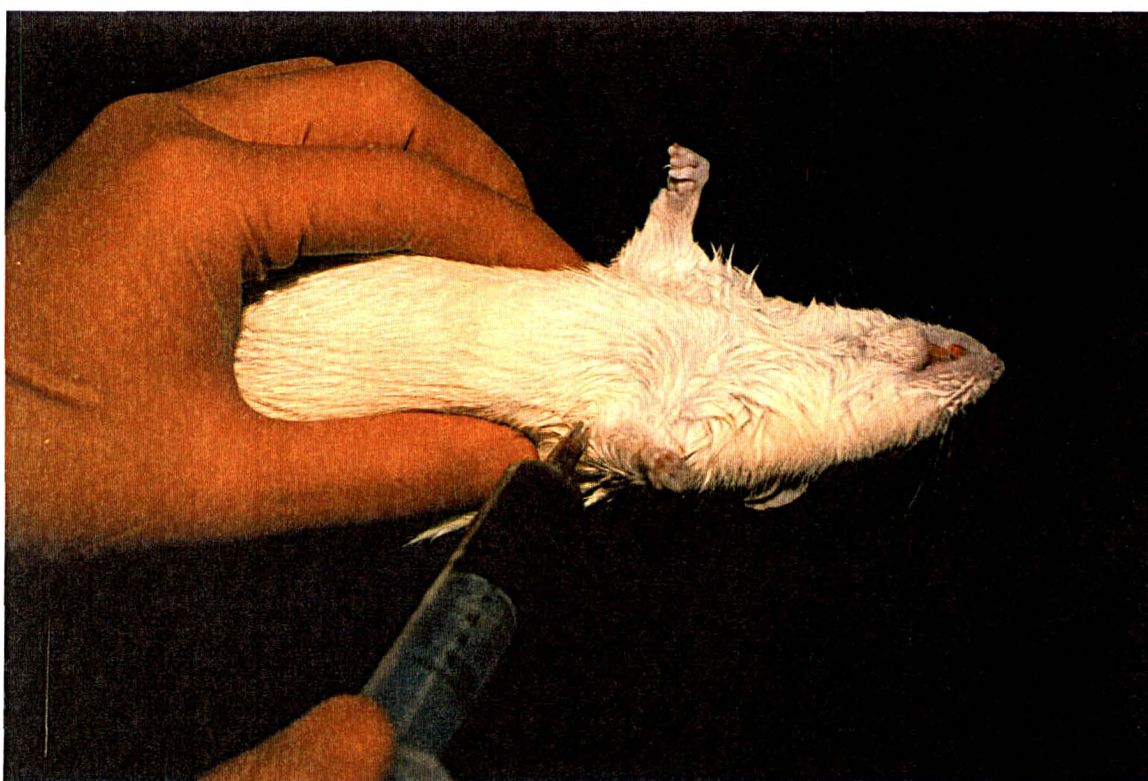


**Figura 2.** Aspecto azulado do rato logo após a inoculação do azul de Evans.

Foram estabelecidos os seguintes períodos para as coletas de amostras de sangue e cólon, e sacrifício dos animais: 15', 30', 60', 2h, 4h, 8h, 16h, 32h, 2d, 4d, 8d e 16d após a inoculação

#### 3.1.4 Coleta de sangue

Estando os animais selecionados para a coleta, sob anestesia inalatória com éter sulfúrico comercial procedeu-se a punção cardíaca com seringas heparinizadas e agulhas 2,5 x 7,0 mm. A seguir o sangue coletado foi centrifugado e o plasma sobrenadante colocado em frascos de vidro tampados e acondicionados a - 20 ° C até sua avaliação laboratorial.

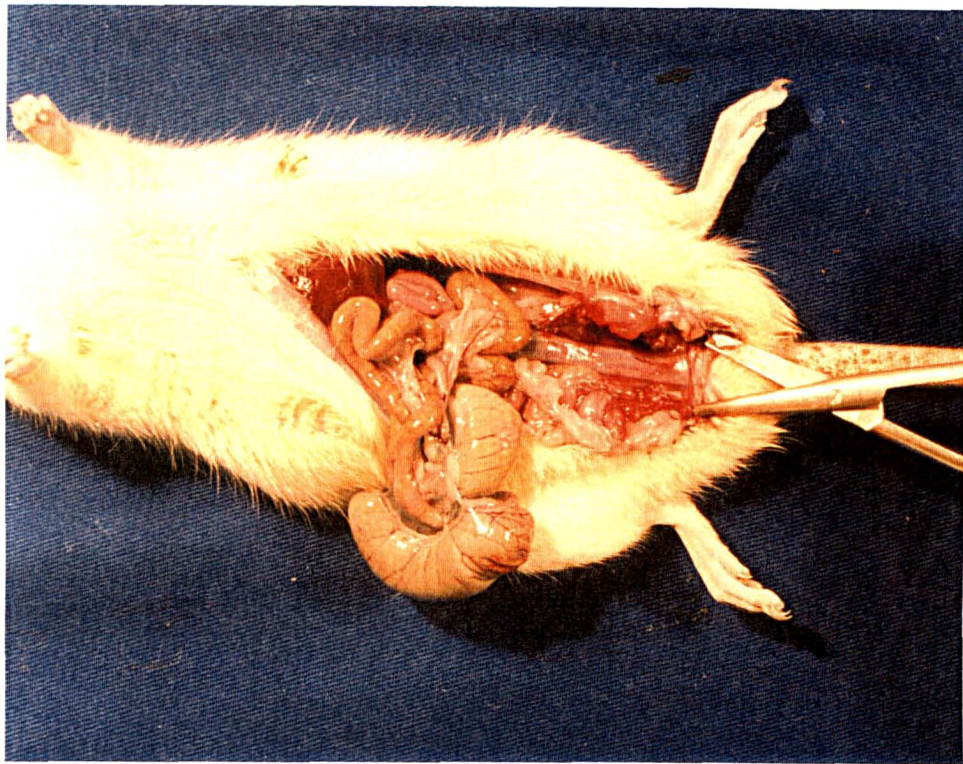


**Figura 3.** Punção intracardiaca para a obtenção de amostras sanguíneas.

### 3.1.5 Coleta de fragmentos de cólon

Após a coleta de sangue, realizou-se abertura da cavidade abdominal dos animais, através de incisão médiana xifopúbica, e da sínfise púbica, incidindo sobre o reto

no nível da sua união com o ânus. A partir deste, retirou-se um fragmento de 3 cm de cólon distal. Os fragmentos foram lavados e retirados resíduos de fezes e sangue, pesados em balança de precisão e colocados em tubos de vidro, que foram tampados. Adicionou-se formamida numa proporção de 4 ml por grama de fragmento de tecido. As amostras foram acondicionadas e deixadas na estufa à temperatura de 22 ° C, durante 24 horas.



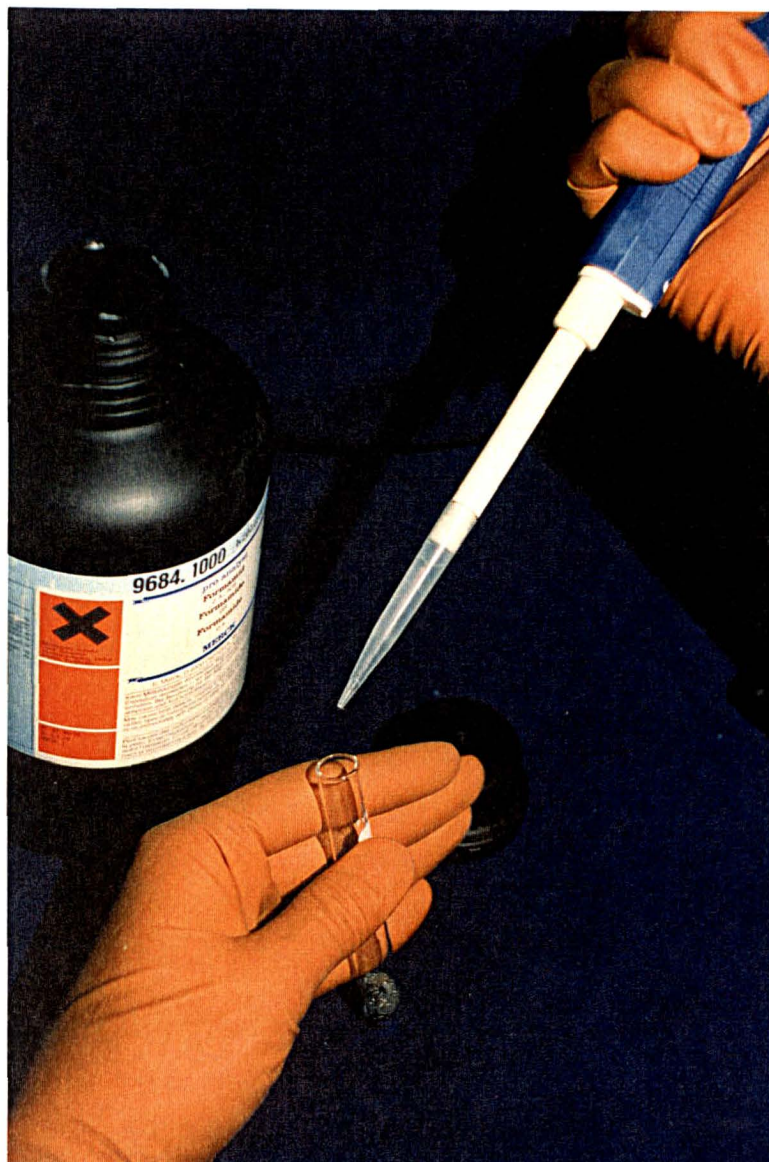
**Figura 4.** Demonstração do local da secção do reto em sua união com o ânus.



**Figura 5.** Fragmento de cólon impregnado com azul de Evans



**Figura 6.** O fragmento de cólon de rato situado na parte superior da figura corresponde a um animal não inoculado com azul de Evans , e na parte inferior, um fragmento de cólon de rato 8 h após a inoculação do corante.



**Figura 7.** Adição de formamida ao frasco que contém o fragmento de cólon.

## 3.2 SOLUÇÕES E REAGENTES

### 3.2.1 Solução do azul de Evans

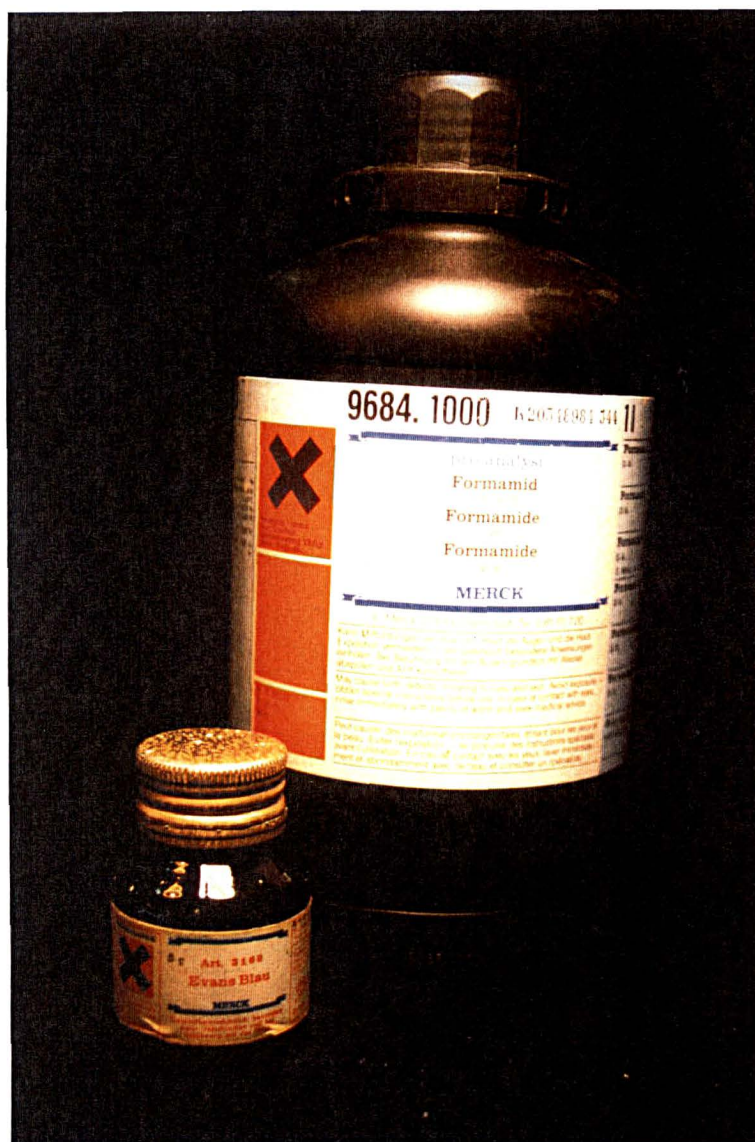
Foi preparada a solução do azul de Evans, MERCK<sup>®</sup>, artigo 3169, a 2,5 % ( peso/volume ) em solução fisiológica ( 0,9 % de NaCl ). A solução continha 25 mg do azul

de Evans por mililitro, sendo a seguir esterilizada por filtração em membranas de 0,22 micra MILLIPORE<sup>®</sup>, conservada posteriormente entre 4 a 8°C.

Desta solução, foram preparados os inóculos para os ratos e os padrões para micro leituras espectrofotométricas.

### 3.2.2 Formamida

Utilizou-se Formamida MERCK<sup>®</sup>, artigo 9684.1000, para a extração do corante das amostras teciduais.



**Figura 8.** Frascos de formamida e do azul de Evans.

### 3.2.3 Solução de Hidrato de Cloral

Preparada a 10% ( peso/volume ) a partir de Hidrato de Cloral REAGEN<sup>®</sup>, em solução fisiológica. A seguir foi filtrada em membrana esterilizante MILLIPORE<sup>®</sup>, com porosidade de 0,22 micras.

## 3.3 MÉTODOS DE AFERIÇÃO

### 3.3.1 Dosagem do azul de Evans em tecido colônico por micrométodo espectrofotométrico em leitor de microplaca de ELISA

Para a determinação do azul de Evans nos extratos de cólon, empregou-se a seguinte metodologia:

#### 3.3.1.1 Preparo da solução padrão do azul de Evans

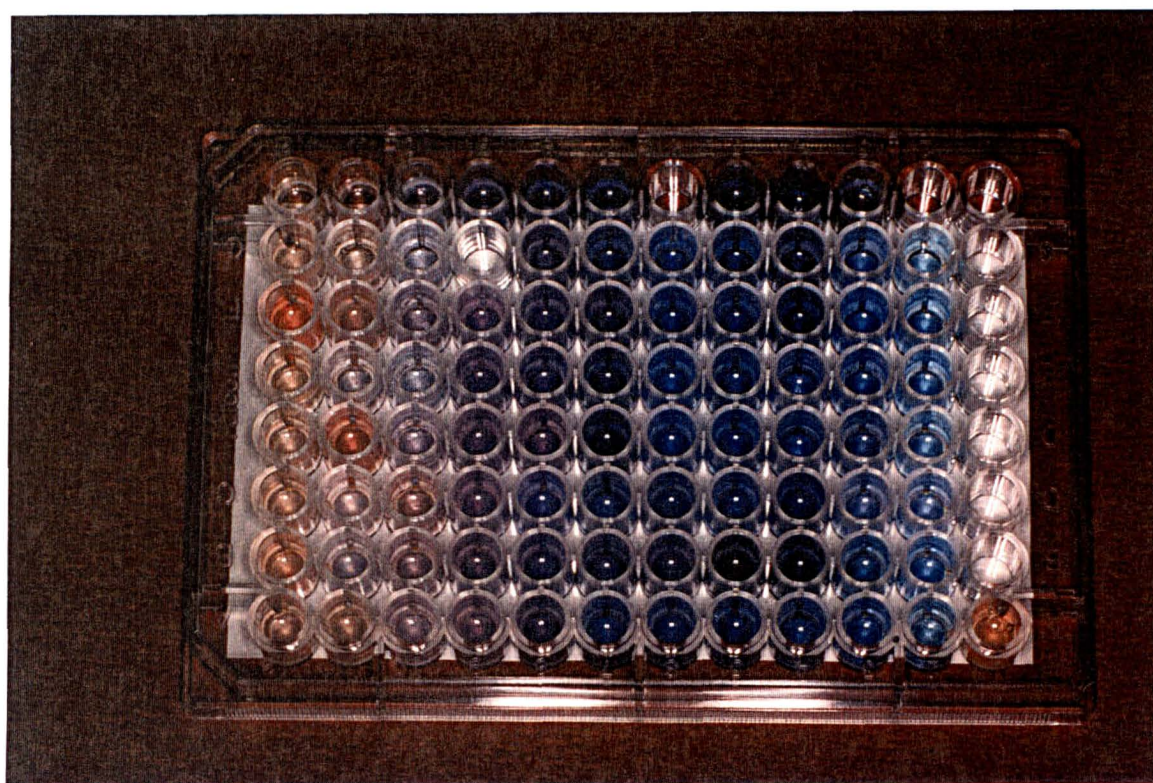
A solução do azul de Evans a 2,5% foi submetida a diluições sucessivas em solução fisiológica com pipeta automática GILSON<sup>®</sup>, conforme Quadro I.

**Quadro I - Preparação das diluições da solução padrão do azul de Evans em solução fisiológica**

DILUIÇÃO	VOLUME DE SOLUÇÃO FISIOLÓGICA ( µl )	VOLUME DE SOLUÇÃO PADRÃO AZUL DE EVANS ( µl )
1/ 1.500	500	1.000
1/ 2.000	1.000	1.000
1/ 2.500	1.500	1.000
1/ 3.000	2.000	1.000
1/ 3.500	2.500	1.000
1/ 4.000	3.000	1.000
1/ 4.500	3.500	1.000
1/ 5.000	4.000	1.000

### 3.3.1.2 Leitura espectrofotométrica da solução padrão do azul de Evans

Após a preparação das diluições, foram tomados 150  $\mu$ l de cada diluição e distribuídos nos orifícios da placa de Terazaki, CORNING<sup>®</sup>.



**Figura 9.** Placa de Terazaki utilizada para leitura espectrofotométrica

A seguir foi realizada a leitura da densidade óptica de cada orifício da placa, em leitor de microplaca BIO-TEK<sup>®</sup>, BT - 100 com filtro de 620 nm de comprimento de onda, frente a um branco de formamida. Os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão linear para obter a equação da reta e coeficiente de correlação ( $r$ ) entre as densidades ópticas e as concentrações do azul de Evans.

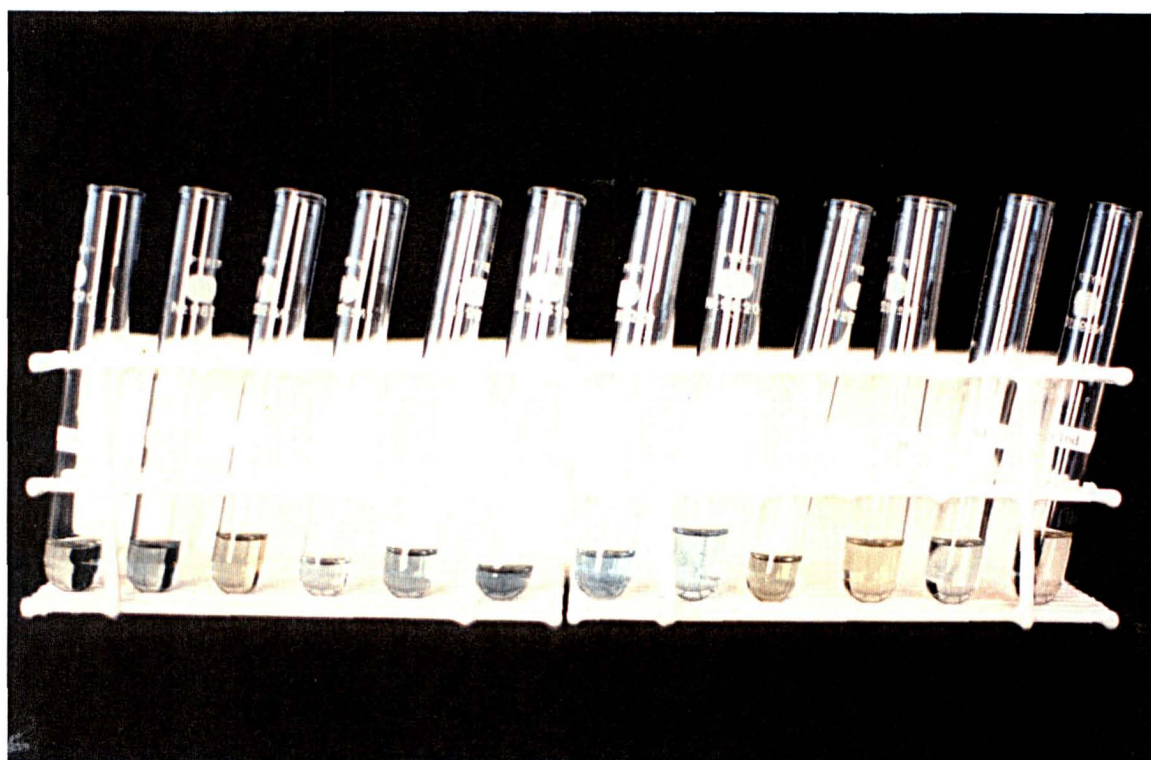


**Figura 10.** Leitor de microplacas BIO-TEK<sup>®</sup>, BT-100

### 3.3.1.3 Leitura espectrofotométrica dos extratos de fragmentos de cólon em formamida

Após retirados os extratos da temperatura de - 20°C, estes foram colocados à temperatura ambiente por 30 minutos e homogeneizados por 15" no agitador de tubos PHOENIX<sup>®</sup>, modelo AT-56. Pipetou-se com pipeta automática GILSON<sup>®</sup>, 150 µl de cada extrato em cada orifício da placa de Terazaki e foram submetidos à leitura em leitor para microplacas de ELISA, frente a um branco de formamida em filtro de 620 nm de comprimento de onda.

As leituras obtidas foram extrapoladas na curva de standardização da solução padrão do azul de Evans e calculadas as concentrações das amostras em microgramas por mililitro e microgramas por grama de fragmento de cólon.



**Figura 11.** Tubos de ensaio contendo os extratos de formamida mais azul de Evans, obtidos nos diferentes períodos de avaliação, durante 16 dias.

### 3.3.2 Dosagem do azul de Evans em plasma de ratos por micrométodo espectrofotométrico em leitor de microplacas de ELISA

Para a determinação do azul de Evans plasmático, empregou-se a seguinte metodologia:

### 3.3.2.1 Preparo da solução padrão do azul de Evans em plasma de ratos

A solução do azul de Evans a 2,5 % foi submetida a diluições sucessivas em plasma de ratos ( sadios sem terem sido submetidos a experimentação ). As diluições foram preparadas com pipeta GILSON<sup>®</sup>, conforme Quadro II.

**Quadro II** Preparação das diluições da solução do azul de Evans em plasma de ratos

DILUIÇÃO	VOLUME DE PLASMA DE RATOS ( $\mu$ l )	VOLUME DE SOLUÇÃO PADRÃO AZUL DE EVANS ( $\mu$ l )
1/ 256	1.000	1.000 $\mu$ l da diluição previa 1/128
1/ 512	1.000	1.000 $\mu$ l da diluição previa 1/256
1/ 1024	1.000	1.000 $\mu$ l da diluição previa 1/512
1/ 2.048	1.000	1.000 $\mu$ l da diluição previa 1/1024
1/ 4.096	1.000	1.000 $\mu$ l da diluição previa 1/2048

### 3.3.2.2 Leitura espectrofotométrica da solução padrão do azul de Evans em plasma

Após a preparação das diluições foram tomados 150  $\mu$ l de cada diluição e distribuídos nos orifícios das placas de Terazaki, CORNING<sup>®</sup>.

A seguir foi realizada a leitura da densidade óptica de cada orifício da placa em leitor de microplaca BIO-TEK<sup>®</sup>, BT - 100 com filtro de 620 nm de comprimento de onda, frente a um branco de plasma de ratos. Após as leituras os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão linear, para obter a equação da reta e o coeficiente de correlação ( r ) entre as densidades ópticas e as concentrações do azul de Evans.

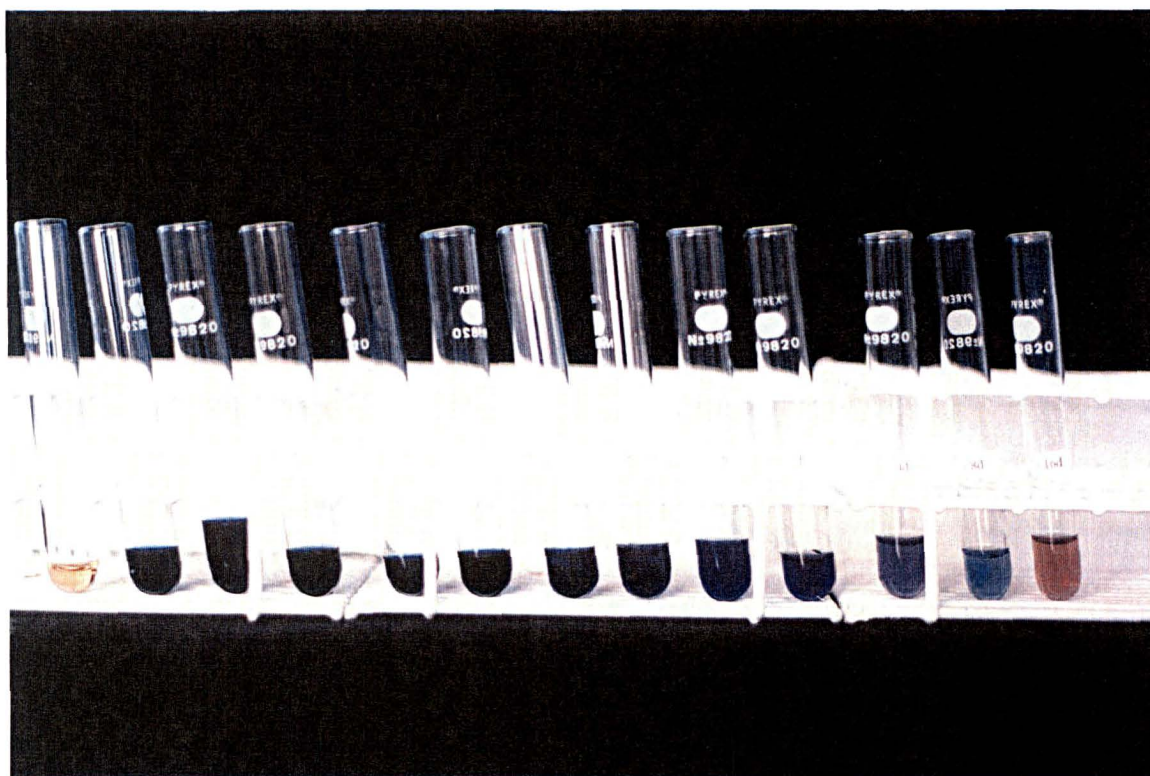
### 3.3.2.3 Leitura espectrofotométrica de plasma de ratos inoculados com azul de Evans

Após retirar os tubos com plasma da temperatura de - 20 ° C, estes foram colocados à temperatura ambiente por 30' e homogeneizados em agitador automático

PHOENIX<sup>®</sup>, modelo AT-56. Pipetou-se com pipeta automática GILSON<sup>®</sup>, 150 µl de cada extrato em cada orifício da placa de Terazaki e foram submetidos a leitura em leitor para microplacas de ELISA, frente a um branco de plasma de ratos não inoculados, em filtro de 620 nm de comprimento de onda.

As leituras obtidas foram extrapoladas na curva de standardização da solução padrão do azul de Evans-plasma e calculadas as concentrações das amostras em microgramas por mililitro.

Quando as amostras apresentavam leitura superior ao limite de saturação do aparelho, foram diluídas em plasma de ratos, procedida leitura espectrofotométrica e convertido o valor da concentração frente ao fator de diluição utilizado.



**Figura 12.** Tubos de ensaio contendo as amostras plasmáticas obtidas nos diferentes períodos de avaliação, durante 16 dias .

### 3.3.3 Análise estatística

#### 3.3.3.1 Determinação da regressão linear

Utilizou-se o método regressão linear, automatizado em calculadora CASIO® 750 PX, conforme as seguintes etapas:

- Cálculo dos coeficientes A e B da equação  $y = A + Bx$

$$A = \frac{\sum Y - B \cdot \sum X}{n}$$

$$B = \frac{n \cdot \sum xy - \sum x \cdot \sum y}{n \cdot \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

- Cálculo do Coeficiente de Correlação ( r ) para os pares dados densidade óptica e concentração da amostra

$$r = \frac{n \cdot \sum xy - \sum x \cdot \sum y}{\sqrt{\{ n \cdot \sum x^2 - (\sum x)^2 \} \{ n \cdot \sum y^2 - (\sum y)^2 \}}}$$

- Cálculo de Médias ( Mx ) e Desvio Padrão ( DP)

$$M_x = \frac{\sum x}{n}$$

$$DP = \sqrt{\frac{\sum^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

#### 3.3.3.2 Desvio-padrão

Os resultados obtidos em cada período de avaliação, foram analisados com relação ao cálculo da média e do desvio-padrão da média.

## **4 RESULTADOS**

## 4 RESULTADOS

Durante o período de observação não ocorreram óbitos entre os animais submetidos à inoculação do azul de Evans.

### 4.1 PESO DOS ANIMAIS

O registro do peso dos animais, em gramas, pode ser observado no Quadro III.

#### Quadro III

Peso dos animais em gramas registrados ao início do experimento.

Rato (n)	Períodos de avaliação										
	15'	30'	60'	2h	4h	8h	16h	2d	4d	8d	16d
1	197,2	319,5	164,0	178,0	319,5	171,5	383,2	330,5	183,1	145,3	166,8
2	198,3	205,1	191,9	209,3	280,3	160,1	162,9	403,0	176,6	168,8	184,8
3	213,5	209,2	162,1	179,5	209,2	278,3	257,7	278,8	177,5	144,7	187,5
4	219,3	254,3	202,5	235,2	156,8	279,9	237,9	401,3	183,2	205,5	179,1
5	213,3	299,4	167,8	225,1	188,8	330,1	183,0	325,5	182,2	155,5	172,1
6	216,8	182,9	234,0	197,2	188,2	277,0	201,7	317,7	185,1	161,8	193,8
7	198,9	172,3	193,6	226,4	213,2	280,4	247,5	162,4	168,0	189,5	179,0
8	218,0	202,5	194,3	203,9	190,2	171,5	169,5	173,4	181,8	182,1	201,5

### 4.2 DOSE DO AZUL DE EVANS

As doses do azul de Evans numa proporção de 20 mg/kg de peso podem ser observadas no Quadro IV

### Quadro IV

Doses do azul de Evans (ml) inoculadas nos 96 animais ao início do experimento numa proporção de 20 mg/kg.

Rato (n)	Períodos de avaliação											
	15'	30'	60'	2h	4h	8h	16h	32h	2d	4d	8d	16d
1	0,15	0,25	0,13	0,14	0,14	0,13	0,30	0,21	0,26	0,15	0,12	0,13
2	0,15	0,16	0,15	0,16	0,22	0,12	0,13	0,27	0,32	0,14	0,14	0,14
3	0,17	0,16	0,13	0,14	0,16	0,22	0,20	0,31	0,21	0,14	0,12	0,15
4	0,17	0,20	0,16	0,18	0,12	0,22	0,19	0,23	0,32	0,15	0,16	0,14
5	0,17	0,23	0,13	0,18	0,15	0,26	0,18	0,25	0,26	0,15	0,12	0,14
6	0,17	0,14	0,18	0,15	0,15	0,22	0,14	0,17	0,25	0,15	0,12	0,15
7	0,15	0,13	0,15	0,18	0,17	0,22	0,19	0,28	0,12	0,13	0,15	0,14
8	0,17	0,16	0,15	0,16	0,15	0,13	0,13	0,18	0,13	0,15	0,15	0,16

### 4.3 PESO DAS AMOSTRAS TECIDUAIS

Os fragmentos de cólon foram pesados e o registro dos pesos das amostras em gramas, podem ser observados no Quadro V.

### Quadro V

Peso dos fragmentos colônicos em gramas, obtidos nos diferentes períodos de avaliação.

Rato (n)	Períodos de avaliação											
	15'	30'	60'	2h	4h	8h	16h	32h	48h	4d	8d	16d
1	0,42	0,41	0,39	0,15	0,17	0,29	0,48	0,49	0,25	0,36	0,54	0,75
2	0,41	0,45	0,37	0,09	0,27	0,33	0,43	0,67	0,20	0,73	0,54	0,66
3	0,57	0,45	0,34	0,12	0,23	0,33	0,72	0,71	0,35	0,39	0,50	0,66
4	0,41	0,47	0,36	0,12	0,26	0,34	0,42	0,46	0,23	0,29	0,44	0,68
5	0,42	0,45	0,43	0,12	0,28	0,34	0,61	0,51	0,29	0,57	0,56	0,55
6	0,58	0,49	0,41	0,16	0,26	0,33	0,53	0,48	0,24	0,30	0,54	0,80
7	0,58	0,53	0,32	0,13	0,23	0,35	0,52	0,84	0,31	0,64	0,54	0,90
8	0,41	0,43	0,34	0,10	0,27	0,36	0,56	0,61	0,29	0,70	0,50	0,46

#### 4.4 VOLUME DE FORMAMIDA

Os volumes de formamida adicionados na proporção de 4 ml/g de tecido colônico estão demonstrados no Quadro VI.

**Quadro VI**

Volume de formamida colocado nos tubos de ensaio numa proporção de 4 ml por grama de fragmento de tecido colônico obtido nos diferentes períodos de avaliação.

Rato (n)	Períodos de avaliação										
	15'	30'	60'	2h	4h	8h	16h	32h	4d	8d	16d
1	1,68	1,64	1,56	0,6	0,68	1,16	1,92	1,96	1,44	2,16	3,00
2	1,64	1,80	1,48	0,36	1,08	1,32	1,72	2,68	2,92	2,16	2,64
3	2,28	1,80	1,36	0,48	0,92	1,32	2,88	2,84	1,56	2,00	2,64
4	1,64	1,88	1,44	0,48	1,04	1,36	1,68	1,84	1,20	1,76	2,72
5	1,68	1,80	1,73	0,48	1,12	1,36	2,44	2,04	2,28	2,24	2,20
6	2,32	1,96	1,64	0,64	1,04	1,32	2,12	1,92	1,16	2,16	3,20
7	2,32	2,16	1,28	0,52	0,92	1,40	2,08	3,36	2,56	2,16	3,60
8	1,64	1,72	1,36	0,40	1,08	1,44	2,24	2,44	2,80	2,00	1,84

#### 4.5 SOLUÇÃO PADRÃO DO AZUL DE EVANS ( 25 mg/ml ) EM PLASMA

Analisou-se os valores de absorbância obtidos para as diluições da solução padrão em plasma, em relação com as concentrações das mesmas para o estudo do índice de correlação (  $r$  ) dos dados. Obteve-se nas diluições da solução padrão em plasma um valor de correlação (  $r$  ) de 0,99539. Os valores de referências obtidos podem ser observados no Quadro VII.

### Quadro VII

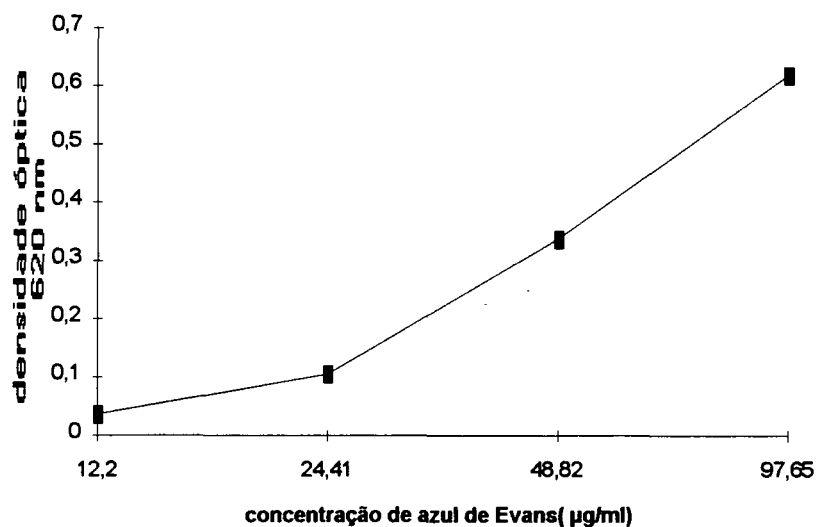
Concentração do azul de Evans da solução padrão e densidade óptica a 620 nm em leitor de microplacas frente a plasma de ratos não inoculados.

concentração ( $\mu\text{g/ml}$ )	densidade óptica
97,65	0,618
48,82	0,337
24,41	0,105
12,20	0,036

O Gráfico 1 ilustra a curva de correlação obtida entre as diversas concentrações da solução padrão em plasma e os respectivos valores de absorbância obtidos.

Gráfico 1

Distribuição gráfica e correlação ( $r$ ) entre as concentrações do padrão do azul de Evans ( $\mu\text{g/ml}$ ) e densidades ópticas a 620 nm - Curva padrão de calibração para determinações plasmáticas.



coeficiente de correlação ( $r$ ) = 0,99539

equação de regressão  $y = ax + b$

$a = -0,04191$

$b = 13,9363$

$y = -0,04191x + b$

$y = \mu\text{g/ml}$

#### 4.6 SOLUÇÃO PADRÃO DO AZUL DE EVANS EM SOLUÇÃO FISIOLÓGICA ( 25 mg/ml )

Os valores de absorvância obtidos para as diluições da solução padrão do azul de Evans em solução fisiológica em relação com as concentrações das mesmas, seguem no Quadro VIII.

#### Quadro VIII

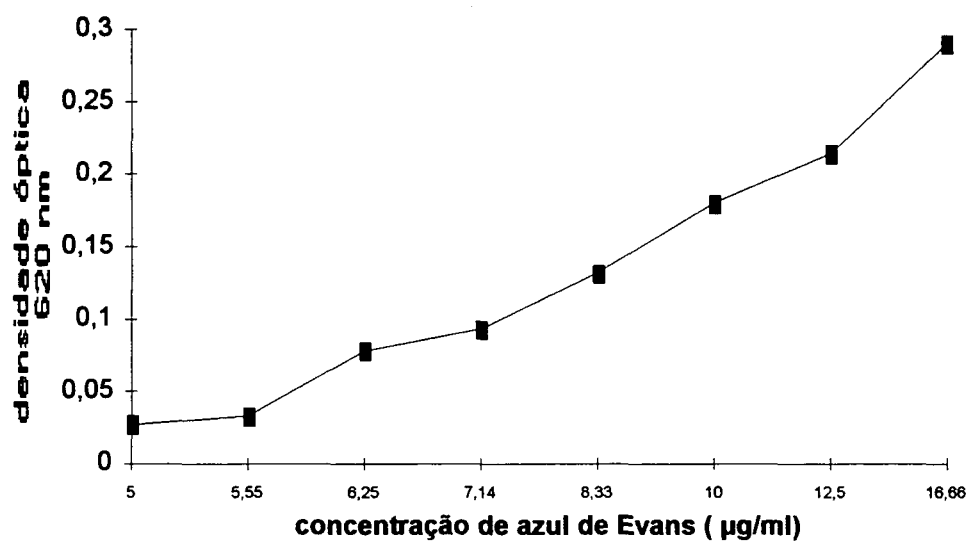
Relação entre concentração do azul de Evans da solução padrão e densidade óptica a 620 nm em leitor de microplaca frente a solução fisiológica como branco.

concentrações ( $\mu\text{g/ml}$ )	densidade óptica-620 nm
16,66	0,290
12,5	0,214
10,00	0,180
8,33	0,132
7,14	0,093
6,25	0,078
5,55	0,033
5,00	0,027

O Gráfico 2 demonstra a correlação obtida entre as diversas concentrações da solução padrão em solução fisiológica e os respectivos valores de absorbância.

### Gráfico 2

Distribuição gráfica e correlação ( $r$ ) entre as concentrações do padrão do azul de Evans ( $\mu\text{g/ml}$ ) e densidades ópticas a 620 nm -  
Curva padrão de calibração para determinações teciduais.



coeficiente de correlação ( $r$ ) = 0,98424

equação de regressão  $y = ax + b$

$a = 3,3312$

$b = 42,70$

$y = 3,3312 x + b$

$y = \mu\text{g/ml}$

#### 4.7 SOLUÇÃO BRANCA

Obteve-se para a solução branca ( plasma ) uma leitura espectrofotométrica da densidade óptica igual a 0,356 e para a formamida de 0,335.

#### 4.8 CONCENTRAÇÃO DO AZUL DE EVANS EM PLASMA

Os valores das concentrações do corante no plasma dos animais, obtidos nos diferentes períodos de avaliação estão presentes no Quadro IX.

#### Quadro IX

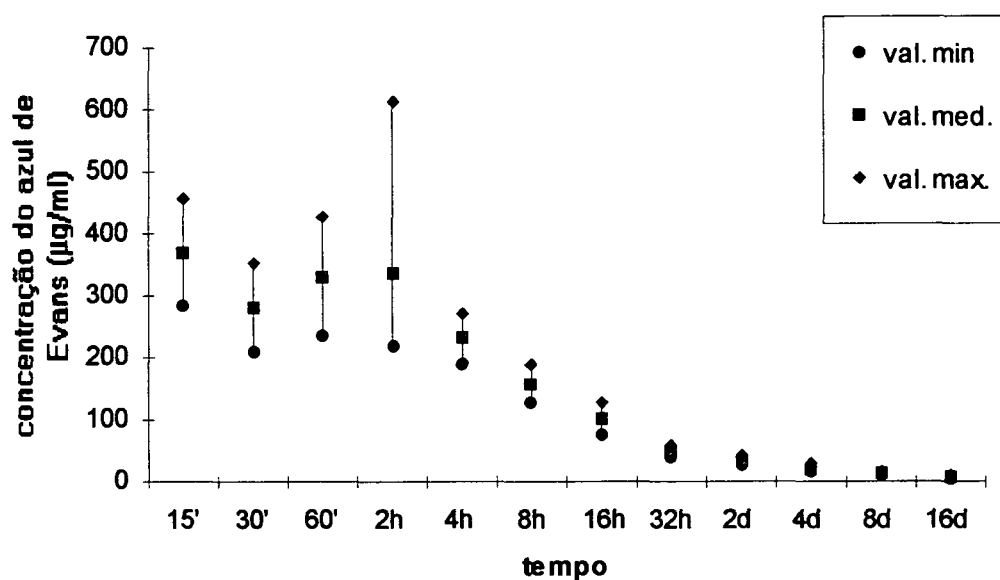
Valores obtidos do azul de Evans ( $\mu\text{g}$  de corante / ml de plasma ) e períodos de obtenção das amostras.

TEMPO	RATOS (n)	VAL. MIN.	VAL. MED.	VAL. MAX.
15'	8	284,2	370,3	456,4
30'	8	210,5	280,8	351,1
60'	8	235,5	330,9	426,4
2h	8	217,7	337,7	614,0
4h	8	190,0	230,9	271,8
8h	8	127,6	158,3	189,1
16h	8	75,5	101,3	128,1
32h	8	40,89	50,0	59,2
2d	8	26,04	33,89	41,7
4d	8	16,24	21,30	30,6
8d	8	9,74	12,45	15,15
16d	8	3,33	6,29	10,51

O Gráfico N ° 3 demonstra a configuração da curva resultante a partir dos valores da concentração do azul de Evans em plasma.

**Gráfico 3**

Concentração do azul de Evans ( $\mu\text{g/ml}$ ), nas amostras plasmáticas obtidas nos períodos estabelecidos, antes do sacrifício.



#### 4.9 CONCENTRAÇÕES DO AZUL DE EVANS NO TECIDO COLÔNICO

Os valores das concentrações do azul de Evans nas peças foram obtidas a partir da leitura espectrofotométrica do extrato do corante em formamida. Extrapolaram-se os resultados na curva da solução padrão do azul de Evans e calculados em  $\mu\text{g/g}$  de peso do fragmento de cólon. Os resultados podem ser observados no Quadro X.

**Quadro X**

Valores do azul de Evans em  $\mu\text{g}$  de corante / grama de tecido e período de obtenção das amostras. Estes valores foram obtidos a partir das concentrações do corante presente no extrato de formamida

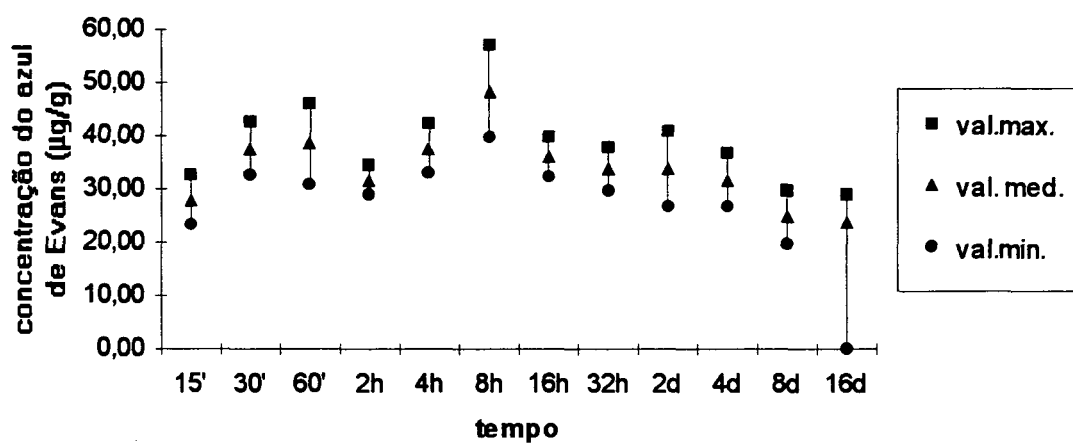
TEMPO	RATOS (n)	VAL. MAX.	VAL. MED.	VAL. MIN.
15'	8	32,64	27,98	23,32
30'	8	42,60	37,68	32,76
60'	8	46,06	38,55	30,88
2h	8	34,56	31,72	28,84
4h	8	42,36	37,65	32,92
8h	8	57,04	48,32	39,60
16h	8	39,80	36,04	32,44
32h	8	37,80	33,72	29,68
2d	8	41,00	33,72	26,64
4d	8	36,72	31,64	26,64
8d	8	29,84	24,72	19,64
16d	8	29,12	23,64	0

4

Os níveis do azul de Evans no tecido colônico estão registrados no Gráfico

Gráfico 4

Distribuição gráfica entre as médias, valores máximos e inferiores do azul de Evans em  $\mu\text{g}$  por g de tecido colônico de ratos, por período de coletas

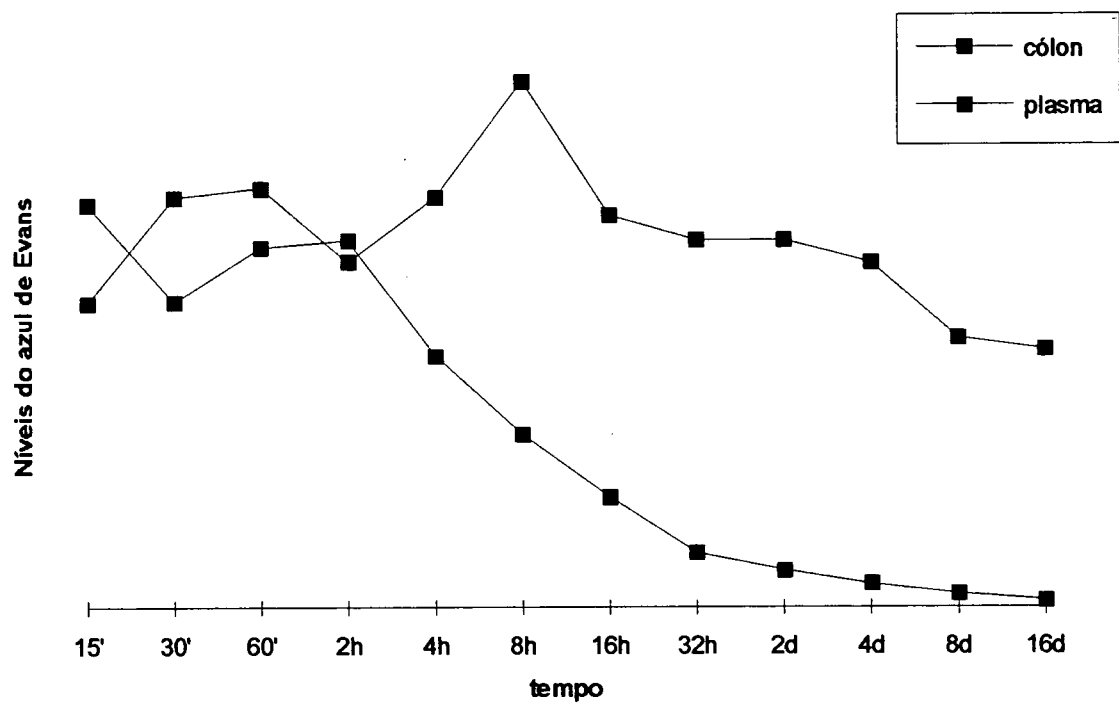


#### 4.10 RELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS E TECIDUAIS

Os resultados das concentrações plasmáticas e teciduais encontram-se relacionados no Gráfico 5

**Gráfico 5**

Demonstração gráfica da relação entre as concentrações do azul de Evans em plasma e tecido colônico encontradas nos diferentes períodos de avaliação

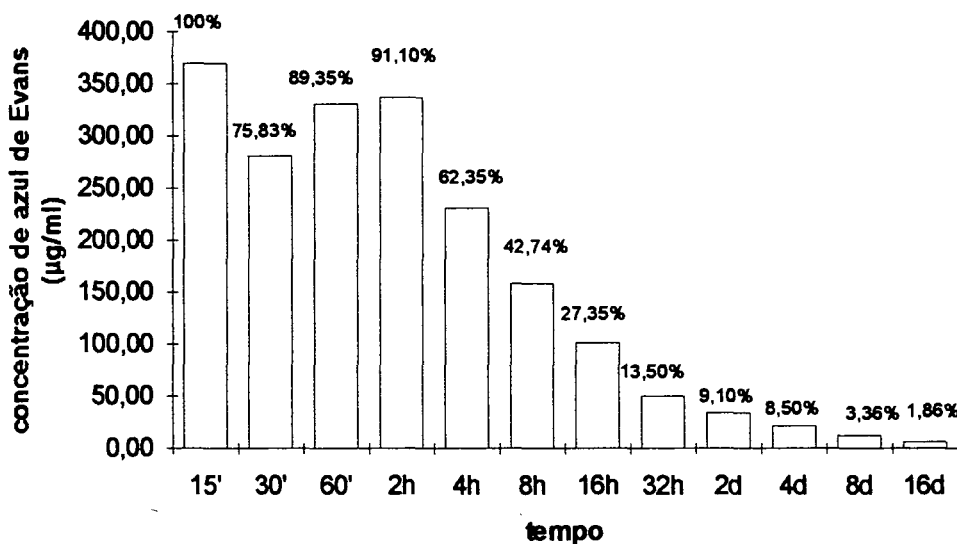


#### 4.11 CLAREAMENTO PLASMÁTICO DO AZUL DE EVANS

As médias das concentrações plasmáticas do azul de Evans e sua relação em porcentagem com a dose inoculada ao início do experimento, estão registradas no Gráfico 6.

**Gráfico 6**

Demonstração gráfica dos valores médios das concentrações plasmáticas do azul de Evans e a relação percentual com a dose inicial inoculada



## **5 DISCUSSÃO**

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 MODELO ANIMAL

O animal utilizado no presente estudo foi o rato da linhagem Wistar-TECPAR, que apresentou baixo custo e pequena área de confinamento, o que foi importante devido ao grande número da amostra. Sendo o animal de baixo peso e estando a dose do corante relacionada com o peso do animal, foram utilizados pequenos volumes do azul de Evans que variaram de 0,13 ml a 0,30 ml. Além disso o rato foi utilizado em estudos de determinação do volume plasmático com o azul de Evans<sup>18, 4</sup> e para avaliar modelos experimentais de processos inflamatórios com enfoques fisiopatológicos e terapêuticos<sup>38, 32, 21, 36, 23</sup>. O único estudo encontrado nesta revisão com referência à mensuração do corante no cólon foi o realizado por CASTER, SIMON e ARMSTRONG ( 1956 ) que estudaram as concentrações do azul de Evans nos diferentes tecidos como base para determinar a curva plasmática do corante, definindo o espaço tecidual do azul de Evans como o volume plasmático dos tecidos<sup>4</sup>. A análise realizada por estes autores não pôde ser comparada aos resultados do presente estudo por envolverem pequeno número de amostras (3 ratos por grupo), períodos de avaliação de somente 120 minutos e os resultados expressados em mililitros do azul de Evans por porcentagem de tecido. Não encontrando outras descrições de acumulação do azul de Evans no cólon, aplicou-se o método desenvolvido no presente estudo para determinar as concentrações do azul de Evans em  $\mu\text{g/g}$  de tecido colônico de ratos, sem evidências de alterações, que permitam servir de parâmetros para futuras comparações com os níveis a serem encontrados em modelos experimentais de doenças intestinais.

## 5.2 INOCULAÇÃO DO AZUL DE EVANS

A via de inoculação pode ser intravenosa, o que permite a combinação do corante com a albumina difundindo-se por todo o organismo. Para o acesso ao sistema venoso foram utilizadas a veia caudal<sup>4</sup>, veia jugular<sup>5,39</sup>, veia femoral<sup>24</sup> e veia peniana<sup>8,1,6</sup>. A inoculação também pode ser feita intraarterialmente o que permite a combinação de quantidades mínimas de corante com a albumina. O corante assim inoculado difunde rapidamente para os tecidos. BERNAUER em 1980, utilizou a inoculação intraarterial do corante para evidenciar áreas excluídas da circulação posterior a ligadura de um vaso coronariano<sup>2</sup>. No presente estudo utilizou-se a inoculação intravenosa pela veia peniana que apresentou-se de fácil acesso e calibre adequado, permitindo a constatação da completa inoculação da dose do corante. A dose inoculada foi de 20 mg/kg de peso e não demonstrou efeitos deletérios no animal.

## 5.3 OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS COLÔNICOS

Os fragmentos colônicos foram obtidos após anestesia dos animais com éter sulfúrico e prévia punção intracardiaca, para obtenção de 5 a 10 ml de amostra sanguínea. Obtidas as amostras, os animais foram sacrificados com a inalação de éter sulfúrico. O fragmento do tecido incluiu 3 cm de cólon, desde o ânus como limite distal, sendo este uma referência anatômica fixa. Foi escolhido o segmento de cólon distal por apresentar particular interesse para o desenvolvimento de futuros estudos em modelos experimentais de processos inflamatórios nesse segmento. A partir dos níveis de acumulação do azul de Evans em cólon normal, a quantificação do corante em processos inflamatórios permitirá graduar os mesmos.

#### 5.4 PROCESSAMENTO DO MATERIAL

As mudanças da permeabilidade vascular nos processos inflamatórios utilizando o azul de Evans como marcador, foram indicados em alguns casos, mensurando diâmetros das lesões e as intensidades da coloração graduadas em cruces e comparada com um quadro preparado com gotas de doses conhecidas do corante <sup>32</sup>. Essa determinação sendo subjetiva, apresentava falta de precisão. Em outros casos, a determinação do extravazamento nos tecidos era qualitativa, evidenciada pela presença ou não do corante <sup>24</sup>. Utilizando substâncias extratoras do azul de Evans dos tecidos, conseguiu-se determinar os níveis do corante através da leitura espectrofotométrica das densidades ópticas dos extratos. Existem numerosas técnicas que utilizam diferentes substâncias para a extração do azul de Evans acumulados nos tecidos, como a acetona-zefiran <sup>4</sup>, solução de uréia, acetona, reativos de Somogy I e II <sup>5</sup>, formamida <sup>40, 32, 21, 8, 14, 35, 26, 3</sup>, ácido clorídrico, cloreto de benzalcônio, clorofórmio <sup>2</sup>, hidróxido de sódio nitrogenado, hidróxido de potássio nitrogenado, acetona, ácido sulfúrico nitrogenado <sup>33</sup>, sulfito de sódio, acetona <sup>23</sup>, acetona e sulfato de sódio <sup>17</sup>. Sendo o azul de Evans um corante ácido demonstrou-se que num pH neutro a quantidade de moléculas de corante que se combinam com a albumina varia entre 8 e 14 <sup>31</sup>. Diminuindo o pH, essa quantidade aumenta até 70 moléculas de corante por moléculas de albumina <sup>19</sup>. No presente estudo utilizou-se a formamida como extrator do corante. Esta é uma substância de pH alcalino, que determina a modificação do meio neutro fisiológico dos tecidos, diminuindo a afinidade do corante pela a albumina, causando sua liberação desta molécula. O azul de Evans solubiliza-se na formamida, podendo ser lida a densidade óptica do extrato por espectrofotometria. Existe na literatura revisada uma disparidade com relação a tempo de exposição, temperatura e quantidade de formamida para o processamento das peças, não sendo encontrada em nenhuma referência que relacione volume com o peso das amostras. O volume utilizado foi de 4 ml de formamida por grama de tecido, sendo as peças conservadas a 22 °C durante 24 h, evitando desta forma,

problemas de interpretação do período de tempo de extração, temperatura, volume de formamida e tamanho das amostras, como encontrado em algumas frases na presente revisão, tais como "durante a noite" <sup>8</sup>, "temperatura ambiente" <sup>17</sup>, "mais de 24 h" <sup>28</sup>, "72 ou 96 h e 24 ou 36 h" <sup>40</sup>, "pedaços de diferentes tecidos foram colocados em 2 ml de formamida" <sup>36</sup>. Com esta metodologia que utiliza somente uma substância, observou-se a decoloração das amostras teciduais e a formamida de cor transparente adquiriu uma tonalidade cuja intensidade variava segundo a quantidade do corante extraído, medindo-se precisamente por leitura espectrofotométrica.

## 5.5 LEITURA ESPECTROFOTOMÉTRICA

A determinação quantitativa do azul de Evans depende da leitura espectrofotométrica das densidades ópticas, seja no plasma ou nos extratos teciduais. Tem sido reportado o uso de espectrofotômetros com diferentes comprimentos de onda para a determinação da densidade óptica do corante. Segundo evidenciou GREGERSEN em 1938, a absorção espectral do azul de Evans encontra-se entre 620 nm e 625 nm<sup>15</sup>. As correções para a hemólise tornam-se desnecessárias porque a absorção da hemoglobina apresenta seu pico entre 580 nm e 600 nm. Em 1983, GREEN e MARCHESSAULT, e GARDNER em 1986, descreveram a mensuração do azul de Evans utilizando o *HPLC* (*high performance liquid chromatography*) ressaltando a acurácia e sensibilidade do método além de necessitar volumes reduzidos das amostras para a análise cromatográfica <sup>13, 12</sup>. No presente trabalho o uso do leitor de microplacas de ELISA como espectrofotômetro em comprimento de onda de 620 nm, resultou em grande utilidade devido serem necessários somente 150 µl das amostras para a análise, possibilitando a leitura consecutiva de múltiplas amostras em um período curto de tempo.

## 5.6 SOLUÇÃO PADRÃO

Neste estudo avaliaram-se quatro diluições da solução do azul de Evans a 2,5% (25 mg/ml) em plasma de ratos, contendo 97,65  $\mu\text{g}$ , 48,82  $\mu\text{g}$ , 24,41  $\mu\text{g}$  e 12,20  $\mu\text{g}$  do azul de Evans por mililitro. A correlação entre as densidades ópticas e estas concentrações, forneceram um coeficiente de correlação ( $r$ ) de 0,99539 (Gráfico 1) conhecendo-se os valores obtidos para o coeficiente angular ( $a$ ) -0,04191 e o coeficiente linear ( $b$ ) igual a 13,9363 e sendo ( $x$ ) o valor obtido pelas leituras espectrofotométricas calculou-se ( $y$ ) que é a concentração do azul de Evans em  $\mu\text{g/ml}$  de plasma. Estes valores configuraram a curva padrão de calibração para as determinações do azul de Evans em plasma. Foram avaliadas também 8 diluições da solução padrão do azul de Evans a 2,5% (25mg/ml) em solução fisiológica contendo 16,66  $\mu\text{g}$ , 12,5  $\mu\text{g}$ , 10  $\mu\text{g}$ , 8,33  $\mu\text{g}$ , 7,14  $\mu\text{g}$ , 6,25  $\mu\text{g}$ , 5,55  $\mu\text{g}$  e 5  $\mu\text{g}$  do azul de Evans por mililitro. A correlação entre as densidades ópticas e as concentrações do azul de Evans forneceram um coeficiente de correlação ( $r$ ) de 0,98424 (Gráfico 2). Conhecendo-se os valores obtidos para o coeficiente ( $a$ ) igual a 3,3312 e o coeficiente linear ( $b$ ) igual a 42,70 e sendo ( $x$ ) o valor da densidade óptica obtida pela leitura espectrofotométrica calculou-se ( $y$ ) que é a concentração e azul de Evans em solução fisiológica. Estes valores configuravam a curva padrão de calibração para as determinações do azul de Evans em extratos teciduais (formamida mais azul de Evans). Os valores de correlação ( $r$ ) se aproximam ao valor absoluto que é 1, demonstrando alta sensibilidade das leituras espectrofotométricas.

## 5.7 SOLUÇÃO BRANCA

Parte da densidade óptica das amostras plasmáticas com corante se deve a presença de partículas no plasma como hemoglobina e pigmentos biliares que determinam

uma absorção espectral a mais do que as propriamente devidas ao azul de Evans. NIELSEN e NIELSEN em 1962, LINDERKAMP, MADER, BUTENANDT, RIEGEL em 1977 e FOLDAGER e BLOMQUIST, em 1991, propuseram para a correção das leituras espectrofotométricas do azul de Evans em plasma uma equação que determinava a densidade óptica das amostras coradas em dois diferentes comprimentos de onda : 600 nm e 780 nm, encontrando uma relação linear entre o logaritmo do comprimento de onda e o logaritmo da densidade óptica. Isto permitia a correção individual das amostras plasmáticas<sup>25, 20, 9</sup>. Foi utilizado neste estudo para a correção da densidade das amostras plasmáticas coradas, plasma de ratos sem corante com uma densidade óptica lida a 620 nm de 0,356 que foi subtraída da leitura de cada amostra. Para a correção das densidades das amostras teciduais (extratos do azul de Evans em formamida) foi utilizada a mesma formamida com uma densidade óptica de 0,335, densidade comparável a densidade da solução fisiológica utilizada na calibração da solução padrão de referência.

## 5.8 CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DO AZUL DE EVANS

Os resultados obtidos nas determinações das concentrações plasmáticas do azul de Evans demonstrados no Quadro IX e no Gráfico 3 refletem o fluxo transcapilar do azul de Evans do compartimento intravascular ao periférico. A partir do conhecimento do valor médio das doses do azul de Evans inoculadas e do valor médio das concentrações das amostras obtidas aos 15', calculou-se o volume plasmático médio (11,3 ml), resultado comparável aos encontrados por HUANG e BONDURANT em 1956 e por CLAUSEN e LIFSON em 1956<sup>18, 5</sup>. Esse cálculo permitiu o cálculo do volume plasmático porque a distribuição inicial do corante corresponde ao volume plasmático como demonstrado por vários estudos<sup>20, 33, 14</sup>. A concentração média do azul de Evans de 370,3 µg/ml aos 15' representou 100% da dose inoculada; aos 30' representou 75,83%; aos 60', 89,35% ; as 2 h, 62,35%; as 4 h, 42,74%; as 16 h, 27,35%; as 32 h, 13,50%; aos 2 d, 9,10%; aos 4 d, 8,5%;

aos 8 d 3,36% e aos 16 d, 1,86% ( Gráfico 6 ). O declínio do conteúdo intravascular do azul de Evans após a inoculação intravenosa, durante as primeiras horas, resultam da soma da distribuição e eliminação, porém este último seja menos importante, como demonstrado por CLAUSEN e LIFSON em 1956, que encontraram 86% do corante inoculado no organismo, após 140 h de avaliação<sup>5</sup>. Portanto o declínio das concentrações corresponde ao fluxo transvascular ou transferência do corante das proteínas do compartimento vascular para as proteínas do compartimento periférico.

### 5.9 CONCENTRAÇÕES TECIDUAIS DO AZUL DE EVANS

As concentrações teciduais registradas no Quadro X e no Gráfico 4 refletem a transferência do azul de Evans do compartimento vascular para o tecido colônico. Os níveis máximos de transferência foram encontrados as 8h com um valor médio de 48,32  $\mu\text{g/g}$ , refletindo a capacidade de saturação do tecido em ausência de lesões. Este valor deverá ser considerado nos futuros estudos de determinação das concentrações do azul de Evans no cólon em presença de lesão e permeabilidade capilar alterada. Níveis acima dos referidos serão considerados índice de alteração capilar permitindo quantificar essas lesões.

### 5.10 RELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS E TECIDUAIS

As curvas obtidas a partir das concentrações plasmáticas refletem a cinética intercompartimental do azul de Evans. Sendo o cólon somente um órgão do compartimento periférico pelo qual se distribui o corante transferido das proteínas plasmáticas para as teciduais, não há condições para se fazerem conclusões gerais sobre os acontecimentos em outros tecidos por apresentarem diferentes comportamentos como demonstrado por CASTER, ARMSTRONG e SIMON em 1955, porém permitem relacionar os resultados

diante das inflexões presentes nas curvas (Gráfico 5)<sup>4</sup>. O declínio das concentrações coincide com o aumento tecidual avaliado aos 60'. As 2 h se observa uma diminuição da concentração tecidual e um aumento da plasmática. A partir daí as concentrações plasmáticas vão diminuindo em forma progressiva e a colônica aumentando até alcançar um pico máximo as 8 h, para depois diminuir em forma progressiva refletindo provavelmente eliminação metabólica ou interação com outros compartimentos.

## **6 CONCLUSÕES**

## 6 CONCLUSÕES

Analisando os resultados do presente estudo, conclui-se que:

1- Foi possível estandardizar um micrométodo espectrofotométrico, que aplicado para quantificar o azul de Evans, possibilitou a determinação das concentrações em  $\mu\text{g}$  do corante.

2- Determinaram-se as concentrações plasmáticas e teciduais do azul de Evans, o que evidenciou o fluxo transcápilar do corante ao tecido colônico de ratos Wistar.

## **7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 7 REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BACCARO, M. R.; MARIANO, M.; MALUCELLI, B. E. Chronically inflamed tissue activates plasma mediators of vascular permeability. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 23, p. 179 - 185, 1990.
2. BERNAUER, W. Effects of glucocorticosteroids in rats with acute myocardial infarction. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**, Ghent, v. 244, p. 86 -99, 1980.
3. BROKAW, J. J.; WHITE, G. W. Calcitonin gene-related peptide potentiates substance P-induced plasma extravasation in the rat trachea. **Lung**, New York, v. 170, p. 85 - 95, 1992.
4. CASTER, W. O.; SIMON, A. B.; ARMSTRONG, W.D. Evans blue in tissues of the rat. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 183, p. 317 - 321, 1955.
5. CLAUSEN, D. F.; LIFSON, N. Determinations of Evans blue dye in blood and tissues. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Baltimore, v. 91, p. 11 - 14, 1956.
6. CURTI, H. J. V.; WIEZEL, P. H. M.; LIMA, M. A. A.; FERREIRA, M. C. F.; RINCON M. C. A. A histopathologic study of the mechanism of Evans blue staining of myocardial infarct in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 24, p. 455 - 458, 1991.
7. FINK, S. J.; MASHBURN, J. P.; KOTTKE, B. A.; ORSZULAK, T. A. Evaluation of arterialized vein graft permeability with Evans blue dye and iodine 125-labeled albumin. **Annals of Thoracic Surgery**, New York, v. 48, p. 646 - 650, 1989.
8. FLORES, C. A.; MELO, R.; FERREIRA, S. H. The blue infarct: a simple method for the quantitation of myocardial damage in the rat. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 21, p. 561 - 563, 1988

9. FOLDAGER, N.; BLOMQUIST, C. G. Repeated plasma volume determination with the Evans blue dye dilution technique , the method and a computer program. **Computers in Biology and Medicine**, Elmsford, v. 21, p. 35 - 41, 1991.
10. FREEDMAN, F. B.; JOHNSON, J. Equilibrium and kinetic properties of the Evans blue-albumin system. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 16, p. 675 - 681, 1969.
11. FREINKEL, N.; SCHREINER, G. E.; ATHENS, J. W.; HIATT, C. W.; BREESE, S. Artifactual differences in the distribution of T-1824 and I<sup>131</sup>-labeled albumin resulting from mixing prior to administration. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, Saint Louis, v. 43, p. 215 - 226, 1954.
12. GARDNER, M. J. Micromethod for the analysis of Evans blue in plasma using ion-pair high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 381, p. 295 - 303, 1986.
13. GREEN, T. P.; MARCHESSAULT, R. P. Rapid micromethod for the determination of Evans blue in human plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 273, p. 426 - 430, 1983.
14. GREEN, T.P.; JOHNSON, D. E.; MARCHESSAULT, R. P.; GATTO, C. W. Transvascular flux and tissue accrual of Evans blue: effects of endotoxin and histamine. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, Saint Louis, v. 111, p. 173 - 183, 1988.
15. GREGERSEN, M. I. An analysis of colorimetric methods in relation to plasma volume determinations. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, Saint Louis, v. 23, p. 423 - 430, 1938.
16. \_\_\_\_\_. A practical method for the determination of blood volume with the dye T-1824. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, Saint Louis, v. 29, p. 1266 - 1286, 1944.
17. HAAS, D. A.; NAKANISHI, O.; MACMILLAN, R. E.; JORDAN, R. C.; HU, J. W. Development of an orofacial model of acute inflammation in the rat. **Archives of Oral Biology**, Oxford, v. 37, p. 417 - 422, 1992.

18. HUANG, K-C.; BONDURANT, J. H. Simultaneous estimation of plasma volume, red cell volume and thyocyanate space in unanesthetized normal tissue and splenectomized rats. **American Journal of Physiology**, Saint Louis, v. 185, p. 441 - 445, 1956.
19. LEVEEN, H. H.; FISHMAN, W. H. Combination of Evans blue with plasma protein: its significance in capillary permeability studies, blood dye disappearance curves, and its use as a protein tag. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 26, p. 26 - 33, 1947.
20. LINDERKAMP, O.; MADER, T.; BUTENANDT, O.; RIEGEL, K. P. Plasma volume estimation in severely ill infants and children using a simplified Evans blue method. **European Journal of Pediatrics**, Berlin, v. 125, p. 135 - 141, 1977.
21. LUNDBERG, J. M.; SARIA, A. Capsaicin-sensitive vagal neurons involved in control of vascular permeability in rat trachea. **Acta Physiologica Scandinavica**, Oxford, v. 115, p. 521 - 523, 1982.
22. \_\_\_\_\_. Capsaicin-induced desensitization of airway mucosa to cigarette smoke, mechanical and chemical irritants. **Nature**, London, v. 302, p. 251 - 253, 1983.
23. MCMAHON, S. B.; LEWIN, G. R.; ANAND, P.; GHATEI, M. A.; BLOOM S. R. Quantitative analysis of peptide levels and neurogenic extravasation following regeneration of afferents to appropriate and inappropriate targets. **Neuroscience**, Oxford, v. 33, p. 67 - 73, 1989.
24. NAG, S. Protective effect of flunarizine on blood-brain barrier permeability alterations in acutely hypertensive rats. **Stroke**, Dallas, v. 22, p. 1265 - 1269.
25. NIELSEN, M. H.; NIELSEN, N. C. Spectrophotometric determination of Evans blue dye in plasma with individual correction for blank density by a modified Gaebler's method. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, Oxford, v. 6, p. 605 - 617, 1962.
26. NISHIKAWA, M.; IKEDA, H.; FUKUDA, T.; SUZUKI, S.; OKUBO, T. Acute exposure to cigarette smoke induces airway hyperresponsiveness without airway inflammation in Guinea pigs. **Respiratory Disease**, Golnik, v. 142, p. 177 - 183, 1990.

27. NOBLE, R. P.; GREGERSEN, M. I.; PORTER, P. M.; BUCKMAN, A. Blood volume in clinical shock. I. Mixing time and disappearance rate of T-1824 in normal subjects and in patients in shock; determination of plasma volume in man from 10 minute sample. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 25, p. 158 - 171, 1946.
28. OBATA, T.; KOBAYASHI, T.; OKADA, Y.; NAKAGAWA, N.; TERAWAKI, T.; AISHITA, H. Effect of a peptide leukotriene antagonist, Ono-1078 on antigen-induced airway microvascular leakage in actively sensitized Guinea pigs. **Life Sciences**, Oxford, v. 51, p. 1577 - 1583, 1992.
29. PARVING, H. H.; KLEBE, J. G.; INGOMAR, C. J. Simultaneous determination of plasma volume and transcapillary escape rate with I<sup>131</sup>-labeled albumin and T-1824 in the new born. **Acta Pædiatrica Scandinavica**, Stockholm, v. 62, p. 248 - 252, 1973.
30. PATTERSON, C. E.; RHOADES, R. A.; GARCIA, J. G. N. Evans blue dye as a marker of albumin clearance in cultured endothelial monolayer and isolated lung. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda., v. 72, p. 865 - 873, 1992.
31. RAWSON, R. A. The binding of T-1824 and structurally related diazo dyes by the plasma proteins. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 138, p. 708 - 717, 1943.
32. REIS, M. L.; OKINO, L.; ROCHA E SILVA, M. Comparative pharmacological actions of bradikinin and related kinins of larger molecular weights. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 20, p. 2935 - 2946, 1971.
33. RINKEMA, L. E.; BEMIS, K. G.; FLEISCH, J. H. Production and antagonism of cutaneous vascular permeability in the Guinea pig in response to histamine, leukotrienes and A23187. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 230, p. 550 - 557, 1984.
34. ROGERS, D. F.; BELVISI, M. G.; AURSUDKIJ, B.; EVANS, T. W.; BARNES, P. J. Effects and interactions of sensory neuropeptides on airway microvascular leakage in Guinea pigs. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 95, p. 1109 - 1116, 1988.

35. ROGERS, D. F.; BOSCHETTO, P.; BARNES, P. J. Plasma exudation. Correlation between Evans blue dye and radiolabeled albumin in Guinea pigs airway in vivo. **Journal of Pharmacological Methods**, New York, v. 21, p. 309 - 315, 1989.
36. SARIA, A.; LUNDBERG, J. M.; SKOFITSCH, G.; LEMBECK, F. Vascular protein leakage in various tissues induced by substance P, capsaicin, bradykinin, serotonin, histamine and by antigen challenge. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, Berlin, v. 324, p. 212 - 218, 1983.
37. SELLERS, A. L.; GRIGGS, N.; MARMORSTON, J.; GOODMAN, H. A. Filtration and reabsorption of protein by the kidney. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 100, p. 1 - 9, 1954.
38. STEELE, R. H.; WILHELM, D. L. The inflammatory reaction in chemical injury. I. Increased vascular permeability and erythema induced by various chemicals. **British Journal of Experimental Pathology**, London, v. 47, p. 612 - 623, 1966.
39. SZABO, S.; TRIER, J. S.; BROWN, A.; SCHNOOR, J. Early vascular injury and increased vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in the rat. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 88, p. 228 - 236, 1985.
40. UDAKA, K.; TAKEUCHI, Y.; MOVAT, H. Z. Simple method for quantitation of enhanced vascular permeability. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Baltimore, v. 133, p. 1384 - 1387, 1970.
41. WOODS, K. L.; SMITH, L. J.; GRAHAM, D. Y. Intra-gastric accumulation of Evans blue dye as a method for assessing aspirin-induced acute gastric mucosal injury in humans. **Digestive Diseases and Sciences**, New York, v. 33, p. 769 - 773, 1988.