



Mestrado Europeu em Química Analítica Ambiental

Determinação de Parâmetros Físico-Químicos em Xantonas

Anabela Ferreira Gomes

Porto

2005

Mestrado Europeu em Química Analítica Ambiental

Determinação de Parâmetros Físico-Químicos em Xantonas

FACULDADE DE FARMACIA
U. P.
BIBLIOTECA
Data, <u>31/01/2006</u>
Reg. <u>3320</u>
Cota _____

Anabela Ferreira Gomes

FFM
GOM
3320

Porto

2005

Dissertação de candidatura ao grau de
Mestre apresentado à Faculdade de
Farmácia da Universidade do Porto

Universidade do Porto

Porto, 2005

Trabalho realizado no Serviço de Química-Física
e no Serviço de Química Orgânica
da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Orientação: Professor Doutor Carlos Manuel Magalhães Afonso
Co-orientação: Professora Doutora Maria de La Salette Hipólito Reis

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar o meu agradecimento:

Ao Professor Doutor José Luís Fontes da Costa Lima, pela oportunidade que me proporcionou de frequentar o Mestrado Europeu de Química Analítica Ambiental e desta forma fazer investigação;

Ao meu orientador, Professor Doutor Carlos Afonso e à minha co-orientadora, Professora Doutora Maria de La Salette Reis, pela orientação científica, disponibilidade demonstradas e por todos os conhecimentos transmitidos;

Ao Doutor Ian Marr, por me ter recebido e proporcionado a possibilidade de frequentar a Universidade de Aberdeen, bem como por ter contribuído para aumentar o meu conhecimento na monitorização e análise de poluentes atmosféricos;

À Professora Doutora Madalena Pinto, por me ter recebido com o seu simpático sorriso, no Serviço de Química Orgânica desta Faculdade; pelo apoio e carinho sempre presentes;

Aos meus colegas de mestrado, pelo apoio, carinho e amizade;

Aos meus colegas do Serviço de Química-Física, em particular, à Helena, à Marlene, ao Christophe e ao David, pelo apoio, carinho e amizade sempre presentes;

Às minhas colegas e amigas do Serviço de Química Orgânica, em particular, à Raquel, à Sara, à Gisela, à D.Fátima e à Dr^a Maria José, por todo o carinho demonstrado;

De um modo geral, a todos os meus colegas e amigos dos Serviços de Química-Física e Química Orgânica, pelo sorriso sempre presente;

À Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, por me ter aceite como aluna de Mestrado;

Aos meus pais, ao Carlos e à mãe do Carlos, por todo o apoio incondicional e carinho demonstrados em todos os momentos.

ÍNDICE

Resumo

Abstract

Résumé

1 INTRODUÇÃO	1
2 INTERESSE DO ESTUDO DAS XANTONAS	3
2.1 XANTONAS: QUÍMICA E ACTIVIDADE BIOLÓGICA.....	3
2.2 XANTONAS: PERSPECTIVA FARMACOLÓGICA E AMBIENTAL.....	6
3 SISTEMAS SIMULADORES DA BIOMEMBRANA	8
3.1 A BIOMEMBRANA	8
3.1.1 <i>Lípidos membranares: química</i>	9
3.1.2 <i>Caracterização termodinâmica da biomembrana</i>	12
3.1.3 <i>Fixação de moléculas e curvatura da biomembrana</i>	13
3.2 ESTRUTURAS MICELARES.....	14
3.2.1 <i>Estrutura geral das micelas</i>	14
3.2.2 <i>Importância das micelas</i>	16
3.3 ESTRUTURAS VESICULARES: LIPOSSOMAS	18
3.3.1 <i>Classificação e obtenção das vesículas</i>	19
3.3.2 <i>Estabilidade das vesículas</i>	21
3.4 MICELAS E LIPOSSOMAS COMO MODELOS MEMBRANARES	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 REAGENTES, SOLUÇÕES E EQUIPAMENTO	25
4.1.1 <i>Reagentes e soluções</i>	25
4.1.2 <i>Equipamento</i>	26
4.2 SISTEMA OCTANOL/ÁGUA	26
4.3 SISTEMA MICELAR HDPC/TAMPÃO	27
4.4 PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS DE EPC	28
4.5 DOSEAMENTO DO FÓSFORO	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1 COEFICIENTE DE PARTILHA NO SISTEMA OCTANOL/ÁGUA	30
5.2 COEFICIENTES DE PARTILHA NO SISTEMA MICELA/TAMPÃO	35
5.3 INTERACÇÃO COM OS SISTEMAS BIOMEMBRANARES.....	43
5.3.1 <i>Fluidez Membranar</i>	43
5.3.2 <i>Interacções electrostáticas</i>	49
6 CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

RESUMO

Esta dissertação incidiu sobre o estudo de alguns parâmetros físico-químicos de xantonas mono-hidroxiladas obtidas por síntese, designadamente, da 1-hidroxixantona, 2-hidroxixantona, 3-hidroxixantona e da 4-hidroxixantona.

O interesse do estudo destas substâncias reside no facto de muitas delas serem bioactivas, podendo vir a dar origem a novos fármacos. A importância das xantonas reflecte-se ainda em termos ambientais por possivelmente poderem ser utilizadas na eliminação de alguns tipos de poluentes.

Foram efectuados estudos do coeficiente de partilha, de avaliação da fluidez da membrana e das interacções electrostáticas.

O coeficiente de partilha foi estudado num sistema octanol/água, utilizando técnicas espectrofotométricas no UV/Vis, e em micelas de hexadecilfosfocolina (HDPC), como sistemas mimetizadores das membranas biológicas, utilizando técnicas espectrofotométricas de segunda derivada no UV/Vis. Os resultados obtidos conduziram a valores de coeficiente de partilha ($\log P$), superiores quando estes foram determinados no sistema micelar.

A fluidez membranar e as interacções electrostáticas foram estudadas em lipossomas unilamelares (LUV) de fosfatidilcolina de gema de ovo (EPC), obtidas pelo método de hidratação do filme lipídico. Para a determinação destes parâmetros foram utilizadas técnicas espectrofotométricas de fluorescência e espectroscopia de correlação fotónica. Os resultados obtidos mostraram que, não existem alterações na fluidez da membrana dos lipossomas com o aumento da concentração das xantonas estudadas. Os valores obtidos no estudo do potencial zeta (ζ), mostraram não haver uma carga formal entre a superfície da membrana dos lipossomas e as xantonas estudadas.

A formação de dipolos estabilizados por ressonância podem justificar os diferentes comportamentos observados.

ABSTRACT

This thesis studies some physicochemical parameters of mono -hydroxylated xanthone of synthesis, namely the 1-hydroxyxanthone, the 2-hydroxyxanthone, 3-hydroxyxanthone and 4-hydroxyxanthone.

Most of these xanthenes are bioactive substances which could be used in the design of new drugs. Moreover, xanthenes can be also considered from ecological perspective, as they possibly play an important role in the elimination of some kind of pollutants. These facts stresses out the importance of the present study.

The work aimed at the study of partition coefficient, the evaluation of membrane fluidity and electrostatic interactions.

The partition coefficient was studied in octanol /water system using spectrophotometric techniques in UV/Vis and in micelles of hexadecylphosphocoline (HDPC), as a mimic system of the biological membranes, using spectrophotometric techniques of the second-derivative in UV/Vis. The results shown that partition coefficients were higher for micellar system.

Both, membrane fluidity and the electrostatic interactions were determined in unilamellar liposomes (LUV) of phosphatidylcoline of egg yolk (EPC) obtained by the lipidic film hidration method. These parameters were determined by using spectrophotometric techniques of fluorescence and photonic correlation spectroscopy. The results shown that any changes were produced in the membrane fluidity of liposomes when the concentration of xanthenes was increased. Values obtained in the study of the zeta potential (ζ), shown that there is no formal electric charge between the membrane surface of liposomes and studied xanthenes.

Stabilized dipoles formed by resonance can justify the observed behaviors.

RÉSUMÉ

Cette dissertation inclut l'étude de quelques paramètres physico-chimiques de xanthones mono- hydroxylées obtenus par synthèse, plus précisément de la 1-hydroxyxanthone, la 2-hydroxyxanthone, 3-hydroxyxanthone et 4-hydroxyxanthone.

La pertinence de cet étude trouve son fondement dans le comportement bioactive de les xantones qui, ainsi, pourront être utilisées dans la conception de nouveaux médicaments. L'intérêt pour les xantones existe aussi du point de vue écologique dans la mesure où celles-ci jouent possiblement un rôle dans l'élimination de polluants.

Durant ce travail, les paramètres étudiés ont été le coefficient de répartition de la fluidité membranaire et les interactions électrostatiques.

L'étude du coefficient de répartition a été réalisée dans le système octanol/eau en utilisant techniques spectrophotométriques dans la zone UV/ VIS et en utilisant des micelles de hexadecilphosphocoline (HDPC) comme systèmes imitant de la biomembrane ainsi que des techniques spectrophotométriques de la dérivée seconde dans la zone UV/ VIS.

Nous avons obtenu des valeurs de coefficients de répartitions ($\log P$) supérieures quand celles-ci ont été étudiées dans les systèmes micellaires. La fluidité membranaire et les interactions électrostatiques ont été étudiées dans les liposomes unilamellaires (LUV) de phosphatidilcoline de jaune d'oeuf (EPC), obtenus par la méthode d'hydratation du film lipidique. La détermination de ces paramètres a été effectuée en utilisant des techniques spectrophotométriques de fluorescence et spectroscopie de corrélation photonique. Les résultats obtenus montrent qu'il n'existe pas de changement de la fluidité membranaire des liposomes avec l'augmentation de la concentration des xantones étudiées. Les valeurs obtenues dans l'étude des potentiels zêta (ζ), montrent qu'il n'y a pas de charge formelle entre la superficie membranaire des liposomes et les xantones étudiées.

Les dipôles stabilisés formés par la résonance peuvent justifier les différents comportements observés.

1 INTRODUÇÃO

As xantonas são substâncias de origem natural ou sintética que apresentam actividades biológicas muito variadas de acordo com a posição, número e o tipo de substituintes que a estrutura de base, a dibenzo- γ -pirona ou xanten-9-ona, apresenta. Neste contexto, é importante a determinação de parâmetros físico-químicos de substâncias bioactivas, por forma a conhecer o seu comportamento quer a nível farmacológico/biológico quer a nível ambiental. O coeficiente de partilha, P, é um dos parâmetros mais importantes por reflectir o grau de lipofilicidade das substâncias (Ferreira *et al.*, 2003). A sua determinação pode ser efectuada por diferentes processos. A forma clássica de determinação do valor de log P, no sistema octanol/água, é o "método de agitação em frasco" ou *shake flask method*, descrito pela OCDE. Este sistema utiliza técnicas espectrofotométricas no UV/Vis para quantificar a substância na fase orgânica e na fase aquosa. No entanto, mais recentemente, o coeficiente de partilha tem sido determinado em modelos que mimetizam a biomembrana, tais como os sistemas micelares e os lipossomas, utilizando como técnica analítica a espectrofotometria de segunda derivada no UV/Vis (Castro *et al.*, 2001a).

Os valores obtidos para o coeficiente de partilha das xantonas foram determinados em octanol/água (pH 5,0 e pH 7,4) e em micelas de hexadecilfosfocolina/tampão Hepes (pH 7,4). Estes valores mostraram ser superiores quando se utilizam os modelos miméticos da biomembrana. A vantagem dos sistemas micelares em relação ao sistema clássico assenta no facto de os primeiros contabilizarem as interacções electrostáticas estabelecidas entre as regiões polares dos fosfolípidos e as substâncias estudadas (Ferreira *et al.*, 2003).

Os processos de partilha podem ser complementados por fenómenos electrostáticos. As interacções dos grupos polares dos fosfolípidos com moléculas carregadas apresentam a capacidade de modificar o conteúdo iónico da superfície membranar (Seelig *et al.*, 1987 *cit.* Matos, 2001). A utilização de sondas fluorescentes devido às suas características espectrais bem definidas, permitem conhecer a localização das substâncias no sistema membranar e ainda avaliar as interacções estabelecidas (Castro *et al.*, 2001a). Para os estudos da avaliação das interacções membranares, foi utilizada uma sonda fluorescente de localização intermédia, a sonda 6-AS. Este tipo de sondas, da série do ácido n-antróiloxiesteárico (n-AS), apresentam um grupo antracénico ligado em diferentes posições na cadeia alquilo, assinaladas pela

numeração n, através de uma ligação éster (Ferreira *et al.*, 2003). Os estudos da avaliação das interacções membranares foram efectuados em lipossomas unilamelares (LUV) de fosfatidilcolina de gema de ovo (EPC) de pH 7,4.

A anisotropia de fluorescência é uma técnica analítica que visa quantificar o grau de fluidez existente nas estruturas membranares. Baseia-se na excitação fotoselectiva do fluoróforo por luz polarizada (Lakowicz, 1999). A determinação do grau de fluidez foi efectuada para as mesmas estruturas organizadas, lipossomas, e nas condições anteriormente referidas. Os resultados experimentais obtidos mostraram não haver perturbações significativas no grau de fluidez da membrana dos lipossomas.

Os valores obtidos para o estudo do potencial zeta (ζ), mostraram não haver uma carga formal entre a superfície da membrana dos lipossomas e as xantonas estudadas. A formação de dipolos estabilizados por ressonância poderá explicar os comportamentos observados.

A presente dissertação encontra-se organizada em duas componentes: uma primeira parte, que constitui o suporte teórico e uma segunda parte, que apresenta a componente experimental. O suporte teórico é constituído por três capítulos: este capítulo 1, Introdução, o capítulo 2 denominado, Interesse do Estudo dos xantonas, e capítulo 3 designado por, Sistemas Simuladores das Biomembranas. No capítulo 2, é efectuada uma breve exposição da química e da actividade biológica das xantonas e ainda uma abordagem sobre as potencialidades destas substâncias em termos farmacológicos e ambientais. No capítulo 3, são descritas as características estruturais e funcionais da biomembrana e dos sistemas micelares e vesiculares utilizados.

A componente experimental é constituída pelos capítulos 4 e 5. No capítulo 4, Materiais e Métodos, são descritos os vários procedimentos que conduziram à realização dos ensaios experimentais. No capítulo 5, são apresentados e discutidos os resultados obtidos para os diferentes estudos efectuados. Por último, o capítulo 6, Conclusões, é constituído pelas ilações de todos os estudos desenvolvidos nesta dissertação e perspectivas futuras.

2 INTERESSE DO ESTUDO DAS XANTONAS

2.1 Xantonas: Química e Actividade Biológica

A dibenzo- γ - pirona ou xanten-9-ona (fig. 2.1) corresponde ao núcleo básico de uma grande família de substâncias cuja origem pode ser natural ou sintética. As xantonas podem ser agrupadas em xantonas simples oxigenadas, xantonas glicosadas, xantonas preniladas e derivados, e ainda em xantonas mistas (Sousa, 2003). O número e o tipo de substituintes ligados aos diferentes átomos de carbono da referida estrutura de base conferem distintas actividades biológicas/farmacológicas. A primeira xantona natural foi isolada a partir da planta *Gentiana lutea* em 1891. Desde então, um vasto número destas moléculas têm sido isoladas quer de plantas quer de líquens, fungos e fetos (Pinto, 1997; Ranjith e Wijesinghe, 1997).

A biossíntese de xantonas em plantas superiores ocorre segundo a via acetato-xiquimato. Segundo Peres *et al.* (2000) e Fernandes (1996), relativamente às xantonas simples, os átomos de carbono 1-4 (anel A) indicam a via acetato enquanto que os átomos de carbono 5-8 (anel B), apontam a via ácido xiquímico (figura 2.1).

A síntese de xantonas foi introduzida por Grover, Shah e Shah em 1955 (Grover *et al.*, 1955). O método clássico utilizado apresenta como requisitos um derivado do ácido salicílico e um fenol adequado, submetidos a aquecimento, em presença de um agente desidratante como o cloreto de zinco em pentacloreto de fósforo. No entanto, devido a limitações apresentadas por este processo, outras metodologias alternativas foram propostas para a síntese de xantonas simples oxigenadas. A síntese de Ullmann (Moroz e Shvartsberg, 1974) recorre a intermediários de éter bifenílico contendo um grupo carboxilo, o qual cicliza por uma acilação intramolecular ácido catalizada. Também Quillinan e Scheinmann (1973) introduziram a formação de intermediários por acilação de Friedel-Crafts de derivados metoxibenzeno com cloretos de benzoílo apropriados, em presença de cloreto de alumínio em éter. Nesta estratégia de síntese a ciclização a xantonas é efectuada pela eliminação base-catalizada de metanol (Sousa, 2003).

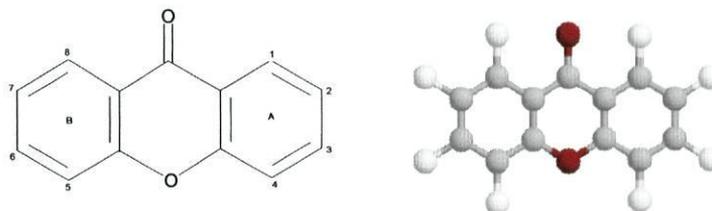


Figura 2.1. Estrutura molecular da xantona. Os átomos a cor vermelha representam átomos de oxigénio.

Aspectos como o isolamento de xantonas a partir de plantas, síntese de novas moléculas, estudos de actividade, da relação estrutura-actividade e também de alguns parâmetros físico-químicos têm sido objecto de estudo de vários investigadores (Sousa *et al.*, 2002; Saraiva *et al.*, 2002 e Núñez *et al.*, 2004).

As actividades biológicas observadas nestas substâncias são muito variadas (tabela 2.1): anti-inflamatória, anti-hepatotóxica, antidiabética e antimalária (Portela, 2003). Outros autores como Bo (2004) e Gnerre *et al.* (2001) sublinham ainda outras capacidades como a inibição da actividade da monoaminoxidase (MAO), actividade antitumoral e actividades anti-bacteriológica e anti-fúngica. Consequentemente, poder-se-á assumir que o estudo das xantonas se reveste de um interesse farmacológico e biológico indiscutível.

Tabela 2.1. Alguns efeitos a nível celular das xantonas oxigenadas.

Xantona (s)	Sistemas- Alvo	Efeito
Xantonas simples polioxigenadas	Enzima conversora da angiotensina I	Inibição
Xantonas simples oxigenadas	3' 5'-fosfodiesterase do AMPc	Inibição
Xantona simples e tetraoxigenada	Fosfolipase C	Inibição
Xantona simples polioxigenadas	Monoaminoxidases A e B	Inibição
Xantonas polioxigenadas	Linfócitos T	Inibição da proliferação
Xantonas simples e tetraoxigenada	Quinase C de proteínas (PKC)	Inibição
Xantonas simples oxigenadas	Vírus da Leucemia murina de Moloney	Inibição
Xantona, xantonas tetraoxigenada	Canais de cálcio	Bloqueio
4-hidroxixantona	Macrófagos	Inibição da fagocitose
Xantonas monoxigenadas	Sistema humano do complemento	Inibição

Fonte: Adaptado de Sousa, 2003.

O estudo incidiu sobre xantonas mono-hidroxiladas, que possuem um grupo funcional hidroxilo (-OH) localizado em diferentes posições no primeiro anel (anel A) (fig. 2.2).

R₁	R₂	R₃	R₄
OH	H	H	H
H	OH	H	H
H	H	OH	H
H	H	H	OH
H	H	H	H

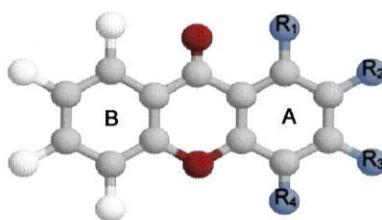


Figura 2.2. Estruturas moleculares das xantonas mono-hidroxiladas. Os átomos a cor a azul simbolizam radicais hidroxilo (-OH), cuja posição no anel A está representada por R₁, R₂, R₃ e R₄.

2.2 Xantonas: Perspectiva Farmacológica e Ambiental

As xantonas são substâncias cuja importância se reflecte quer a nível farmacológico quer a nível ambiental. Em termos farmacológicos a determinação de parâmetros físico-químicos das xantonas tem a maior importância por apresentarem variadas actividades biológicas, conduzir à avaliação da biodisponibilidade, estudar a relação estrutura-actividade e assim contribuir para a planeamento racional de novos fármacos. Em termos ambientais, as xantonas, podem ser abordadas quanto ao impacto ambiental proveniente da sua utilização como fármacos e ainda quanto ao aproveitamento da sua capacidade quelante na sequestração de metais e *scavenger* de radicais livres (Saxena e Seshadri, 1957).

A estrutura molecular das xantonas indica que, os grupos carbonilo (C=O) e hidroxilo (OH), sejam os intervenientes no processo de sequestração de metais, no qual o grupo carbonilo funcionaria como grupo dador de electrões (Saxena e Seshadri, 1957). Segundo Brahm e Jain (1962) a 1-hidroxixantona tem a capacidade de participar na formação de quelatos, designadamente, na sequestração do ião ferro. Ainda outros autores como, Kelly *et al.* (2001), demonstraram a capacidade da 4,5-dihidroxixantona em formar um complexo xantona-heme em estudos de interacções de ligação entre esta molécula e o grupo heme, na qual ocorre a sequestração do ião ferro. Também, Boucher *et al.* (1999), efectuaram estudos de complexação nos quais utilizaram a xanten-9-ona e o ião alumínio. Extrapolando esta capacidade exibida pelas xantonas para o meio ambiente, a possível aptidão natural destas substâncias poderá constituir mais uma alternativa para a eliminação de poluentes e ser uma estratégia eficaz para a resolução de problemas ambientais (Peres *et al.*, 2000; Heinrich, 2002). Contudo, devido à sua estrutura de base, a xanten-9-ona, tem sido também considerada como sendo um possível xenobiótico presente em águas estuarinas (Bester e Theobald, 2000).

Desde os anos 90, que o impacte ambiental de fármacos tem originado uma preocupação crescente, pelo facto de estas substâncias serem introduzidas no meio ambiente aquando a sua excreção pelo organismo ou como resultado de processos de síntese (Daughton e Jones-Lepp, 2001). Consequentemente, estas substâncias encontram-se com frequência no meio ambiente, em cursos de água e nos solos, de onde são transferidas para as cadeias tróficas e submetidas a um processo de bioacumulação. Fármacos antibióticos e estrogénios são particularmente preocupantes pelos efeitos que podem causar, no entanto, é importante conhecer e prever qual o comportamento ambiental de qualquer substância com actividade farmacológica. De entre os muitos parâmetros que afectam a distribuição e a bioacumulação, um dos mais importantes é o log P (Sangster, 1997). Este parâmetro ao mostrar a afinidade de uma substância para a água e para um solvente lipofílico, é frequentemente utilizado para prever e explicar a transferência das substâncias da água para os organismos vivos e a sua tendência para bioacumular. A bioacumulação é o processo pelo qual uma substância química se acumula num organismo numa concentração superior à existente no ambiente (Sangster, 1997). O potencial de bioacumulação de elementos químicos em organismos vivos e no meio ambiente, visa contabilizar o impacte ambiental da actividade humana, sendo efectuado através dos factores de bioconcentração (FBC). Vários estudos apontam para uma correlação positiva entre os valores dos logaritmos da partilha e os factores de bioconcentração (Davis e Carpenter, 1997).

De salientar ainda, que os testes de ecotoxicidade que actualmente se efectuem conduzem à avaliação dos riscos para o meio ambiente, no entanto, não têm em conta a actividade biológica característica das substâncias activas. Assim, a realização de testes de toxicidade quer a longo quer a curto prazo, testes de bioacumulação e testes de biodegradação, são aspectos importantes em termos ambientais (www.mpa.se/om_verket/publikationer/miljoupdraget/040824_miljoupdraget-sammanfattning).

3 SISTEMAS SIMULADORES DA BIOMEMBRANA

3.1 A biomembrana

A estrutura das membranas biológicas é explicada pelo modelo do mosaico fluido, proposto por Singer e Nicholson em 1972 (figura 3.1). O modelo descreve a biomembrana como um fluido bi-dimensional, líquido ou cristal-líquido, no qual se encontram integrados os seus componentes. Quimicamente, a biomembrana é constituída por fosfolípidos e colesterol, por proteínas, localizadas a nível periférico e integradas na bicamada lipídica, e ainda por polissacarídeos (Alberts *et al.*, 2002; Lipowsky, 2002).

A membrana celular é uma estrutura dinâmica sendo a sua fluidez resultante da sua composição química. A flexibilidade é atribuída ao movimento transversal dos fosfolípidos, conhecido por “flip-flop”. Para além deste movimento de “flip-flop”, a biomembrana apresenta ainda movimentos de rotação e de difusão lateral (Alberts *et al.*, 2002). Uma outra característica da estrutura membranar é a sua assimetria apresentada pelas camadas fosfolípídicas. Cada face da bicamada fosfolípídica mostra ter diferentes características, designadamente, a nível da composição lipídica e proteica (Alberts *et al.*, 2002).

A bicamada lipídica não é miscível com o líquido extracelular nem com o líquido intracelular, constituindo uma barreira para o movimento das moléculas de água e de substâncias hidrossolúveis entre os compartimentos intra e extracelular. No entanto, algumas substâncias conseguem atravessar a bicamada lipídica difundindo-se directamente nela, designadamente, as substâncias lipossolúveis (Alberts, 2002).

A biomembrana desempenha ainda outras funções, intervindo em numerosos processos celulares, tais como por exemplo, em mecanismos de comunicação e de transporte celular (Alberts *et al.*, 2002).

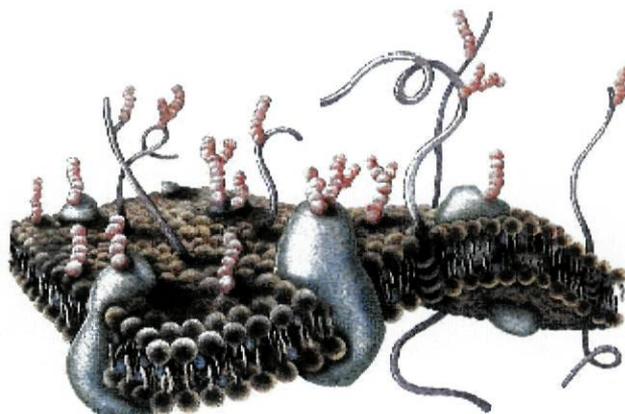


Figura 3.1. Representação do modelo do mosaico fluido da biomembrana (Fonte: www.rena.e12.ve)

3.1.1 Lípidos membranares: química

A constituição genérica de um fosfolípido (figura 3.2) compreende uma parte hidrofóbica constituída por cadeias de ácidos gordos e uma parte polar constituída por um ou mais grupos fosfato, os quais conferem à molécula um carácter hidrofílico (Alberts *et al.*, 2002).

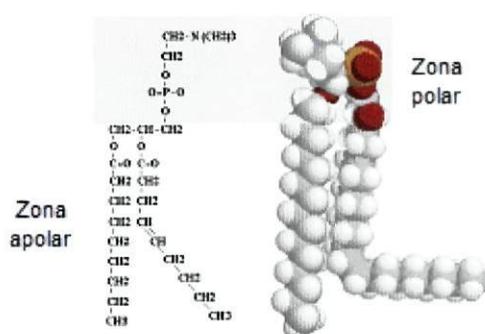


Figura 3.2. Representação da estrutura molecular de um fosfolípido (Fonte: <http://www.web-books.com>).

Os lípidos constituintes das biomembranas distribuem-se principalmente por quatro grupos: fosfolípidos, esfingolípidos, glicolípidos e esteróis. Dos esteróis, o mais

representativo é o colesterol. A estrutura molecular básica destes lípidos bem como os principais substituintes polares (posição X, figura 3.3) das biomembranas encontram-se ilustrados na figura 3.3. As cadeias alquílicas (R1 e R2) podem ser saturadas ou insaturadas e estão compreendidas entre C10 e C28. De um modo geral, os lípidos naturais mostram, uma grande diversidade na composição das cadeias carbonadas, em oposição aos lípidos sintéticos, que habitualmente apresentam uma composição em ácidos gordos muito homogénea. Devido à biossíntese dos ácidos gordos, os fosfolípidos naturais apresentam um número par de átomos de carbono, enquanto que os ácidos gordos de síntese podem possuir um número ímpar destes átomos (Matos, 2001; Lasic, 1993). Os ácidos gordos saturados mais frequentes nas biomembranas são o mirístico (C14), o palmítico (C16) e o esteárico (C18). Dos insaturados, o mais importante é o ácido oleico, com 18 átomos de carbono e uma dupla ligação em C-9 (Matos, 2001).

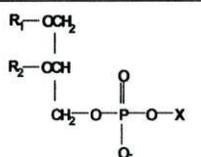
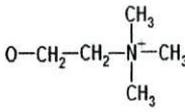
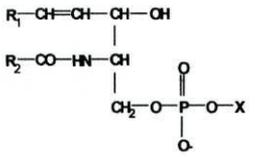
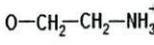
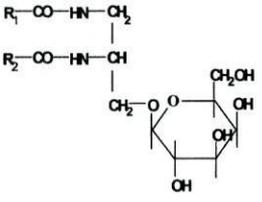
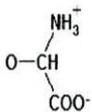
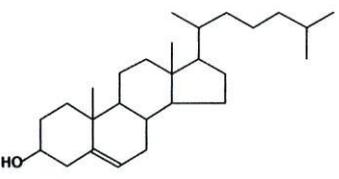
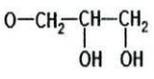
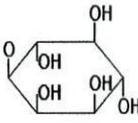
Grupos lipídicos constituintes da biomembrana	Principais substituintes polares (posição X)
 <p>Fosfolípido</p>	 <p>colina</p>
 <p>Esfingolípido</p>	 <p>etanolamina</p>
 <p>Glicolípido</p>	 <p>serina</p>
 <p>Colesterol</p>	 <p>glicerol</p>
	 <p>inositol</p>

Figura 3.3. Estrutura química dos principais grupos de lípidos constituintes da biomembrana (Fonte: Matos, 2001).

Exemplos concretos desses substituintes polares encontram-se seguidamente ilustrados (fig. 3.4).

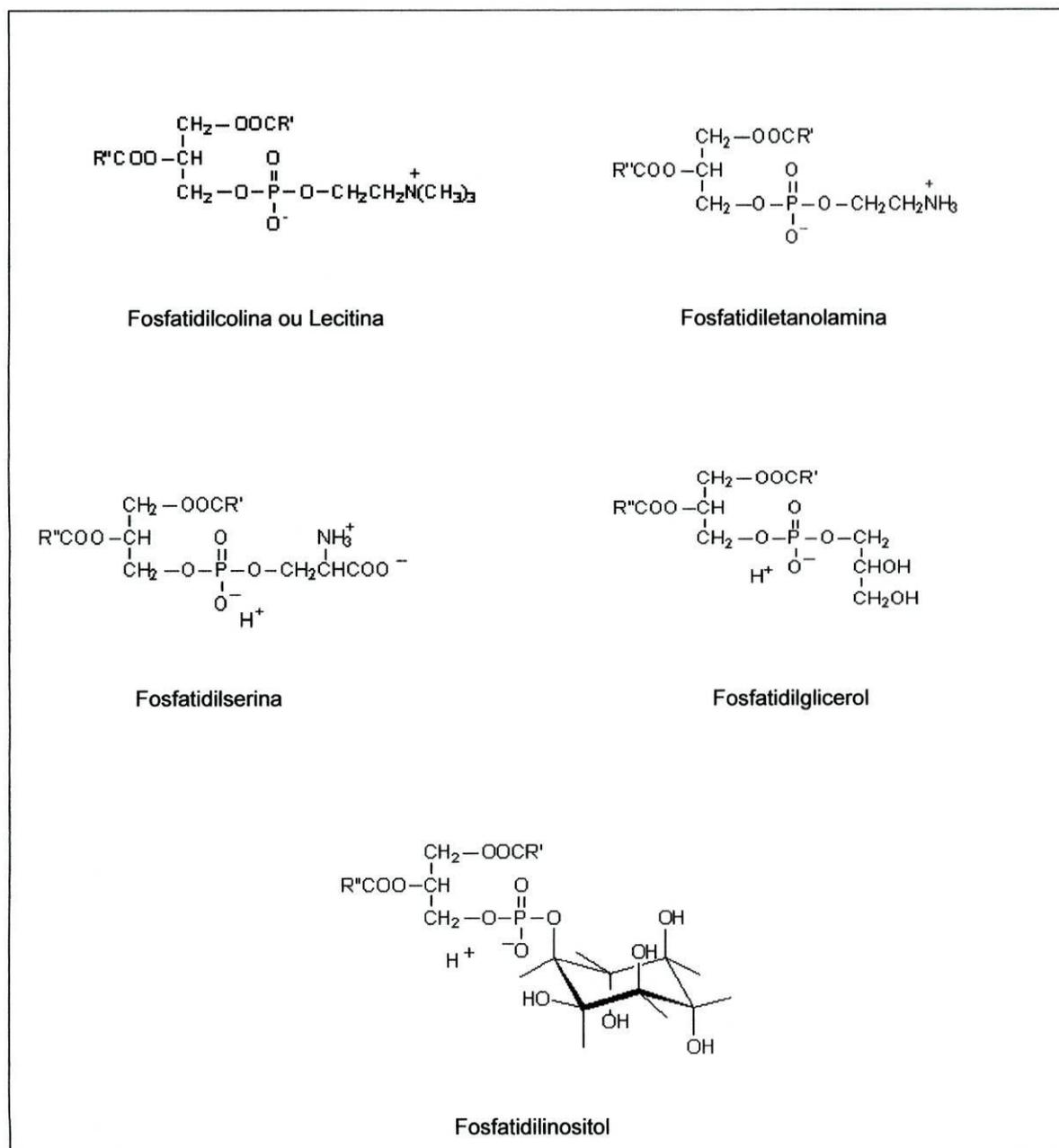


Figura 3.4. Representação da estrutura molecular de possíveis grupos polares existentes nos fosfolípidos.

Os fosfolípidos contendo colina e etanolamina constituem moléculas zwitteriônicas a pH fisiológico, porque apresentam o grupo amônio quaternário com carga positiva e o grupo fosfato desprotonado para esse valor de pH (Matos, 2001).

3.1.2 Caracterização termodinâmica da biomembrana

Do ponto de vista termodinâmico, uma característica importante apresentada pela bicamada lipídica é a existência de uma temperatura, específica para cada fosfolípido, para a qual a organização dos fosfolípidos sofre uma alteração. Neste contexto, a bicamada fosfolípídica pode apresentar-se numa fase de grande ordenação, designada por estado de gel-sólido ou OL (do inglês, *ordered liquid*) na qual os fosfolípidos se encontram imóveis com as cadeias carbonadas de ácidos gordos estruturalmente ordenadas. Acima do seu ponto de fusão, os fosfolípidos transitam para uma fase mais fluída denominada cristal- líquido ou DL, (do inglês, *disordered liquid*) formando estruturas fracamente empacotadas, com elevada mobilidade lateral e com as cadeias carbonadas estruturalmente desordenadas (figura 3.5). Uma terceira fase intermediária pode ainda ser considerada, a fase líquida ordenada, na qual os fosfolípidos apresentam mobilidade lateral e cadeias carbonadas ordenadas (Helms e Zurzolo, 2004; Castelli et al., 2004).

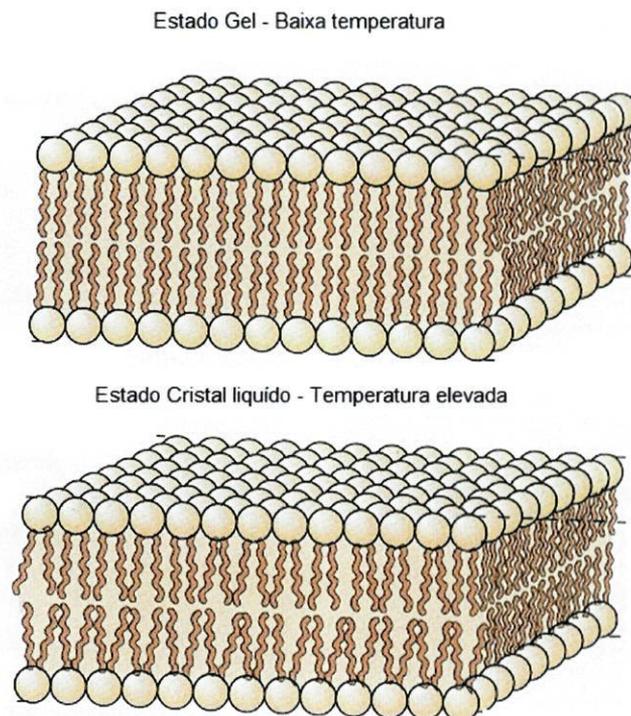


Figura 3.5. Representação da organização estrutural apresentada pelos fosfolípidos nos estados de gel e cristal-líquido. (Fonte: Wolfe, 1993)

A temperatura de transição de fase, T_c , característica para cada fosfolípido, compreende um intervalo de temperaturas para o caso de fosfolípidos com

composição heterogénea. A amplitude do intervalo de temperaturas, que pode ser superior a 10 °C, depende fortemente da composição lipídica da amostra (Lasic, 1993). No que respeita aos fosfolípidos sintéticos puros, antes da fase de transição (T_c), muitos destes fosfolípidos apresentam uma fase de pré-transição (T'_c), para a qual as cadeias carbonadas que apresentem torção se orientam paralelamente ao eixo da bicamada (Matos, 2001).

A temperatura de transição de fase dos fosfolípidos depende da natureza do grupo polar, do comprimento e do grau de insaturação das cadeias alquílicas. De um modo geral, a temperatura de transição de fase apresenta uma relação directamente proporcional ao comprimento das cadeias dos ácidos gordos esterificantes e inversamente proporcional ao grau de insaturação (Matos, 2001).

3.1.3 Fixação de moléculas e curvatura da biomembrana

O processo de fixação pode ocorrer na parte terminal do grupo polar do fosfolípido ou estender-se ao longo das cadeias carbonadas deste. As moléculas fixadas e/ou adsorvidas exercem pressão na biomembrana induzindo sobre esta uma curvatura localizada. O grau dessa curvatura reflecte as contribuições da entropia e da entalpia da interacção estabelecida entre a biomembrana e a molécula. A difusão lateral de moléculas conduz à existência de colisões que também contribuem para a curvatura (Lipowsky, 2002).

A extensão da ligação das moléculas à membrana lipídica, processo quantificado pelo coeficiente de partilha (P), bem como a sua localização na biomembrana, são aspectos importantes. Assim, valores de coeficiente de partilha elevados ($\log P > 3$) aumentam a probabilidade de a substância interagir com o receptor. Adicionalmente, para que a substância possa interagir adequadamente com este, terá que penetrar a uma profundidade adequada na membrana lipídica, até que alcance o local activo. A orientação com que a substância se localiza na biomembrana é igualmente importante, uma vez que deverá estar em concordância relativamente à posição do local activo do receptor (Matos, 2001).

3.2 Estruturas micelares

3.2.1 Estrutura geral das micelas

Moléculas anfifílicas são moléculas que contêm um grupo polar numa das extremidades e um grupo apolar na outra extremidade. O referido tipo de moléculas apresenta, assim, afinidade simultaneamente para as fases aquosa e apolar. A partir de determinado valor de concentração designada por concentração crítica, as moléculas atingem o seu limite de solubilidade e iniciam o processo de auto-agregação, organizando-se numa micela (Njus, 2000). A estrutura micelar é constituída por moléculas anfifílicas cuja parte polar se encontra em contacto com a fase aquosa e a parte apolar voltada para o interior da micela. O limite de solubilidade anteriormente mencionado é denominado por concentração micelar crítica (cmc). Acima do valor de concentração micelar crítica, tais moléculas apresentam a capacidade de auto-agregação formando diferentes tipos de estruturas organizadas, exemplificadas na figura 3.6 (Matos, 2001; Njus, 2000).

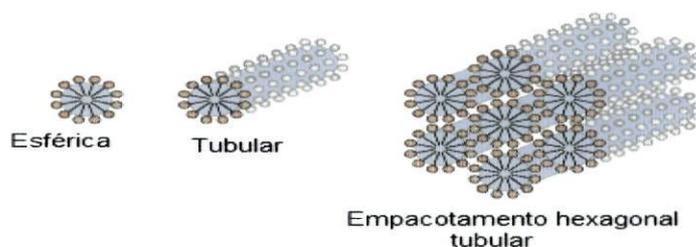


Figura 3.6. Representação esquemática da morfologia micelar (Fonte: <http://www.chemsoc.org>).

A formação espontânea de micelas envolve dois factores. O efeito hidrofóbico e a interacção dos grupos polares, os quais interferem na energia livre da estrutura micelar. O efeito hidrofóbico é o responsável pela apreensão da parte não polar da molécula no interior da micela enquanto que as interacções dos grupos polares determinam o grau de empacotamento das moléculas na micela (Njus, 2000).

A figura 3.7. ilustra uma micela esférica, com os seus grupos polares voltados para a solução aquosa e as cadeias carbonadas hidrofóbicas para o interior.

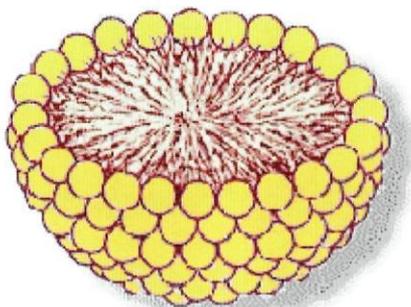


Figura 3.7. Representação esquemática de uma micela esférica (Fonte: <http://www.saints.css.edu>).

O número de moléculas do monómero que constitui a micela é designado por número de agregação (Ag#). Este número é o responsável pela forma e dimensão da estrutura final. De um modo geral, uma micela apresenta um diâmetro entre 26 e 60 Å e o número de monómeros está compreendido entre 50 e 100 (Rakotomanga, 2004; Matos, 2001). A estrutura micelar mais frequente é formada por um núcleo, constituído pelas cadeias hidrocarbonadas e uma camada mais externa constituída pelos grupos polares e por contra-íões, designada por camada de Stern. Uma região adjacente a esta, constituída por uma elevada densidade de contra-íões é denominada por dupla camada de Gouy-Chapman (Matos, 2001).

A concentração micelar crítica e o número de agregação constituem dois aspectos fundamentais para a caracterização de uma micela. Njus (2000), apresentou algumas considerações gerais sobre como estes dois parâmetros podem estar relacionados. O aumento do comprimento da cadeia hidrocarbonada da molécula anfifílica diminui quer a solubilidade quer a concentração micelar crítica. Por motivos semelhantes, moléculas anfifílicas com duas cadeias hidrocarbonadas, como os fosfolípidos, apresentam uma concentração micelar crítica de menor valor quando comparada com moléculas que possuem uma única cadeia hidrocarbonada, como é o caso dos detergentes. O aumento da força iónica promove uma diminuição das forças repulsivas estabelecidas entre os grupos polares de detergentes iónicos aumentando

assim o número de agregação, contrariamente ao que ocorre com os detergentes não iónicos (Njus, 2000).

Os principais locais de interacção entre solutos e a micela podem ocorrer a vários níveis (figura 3.8). Moléculas com características polares podem sofrer adsorção à superfície micelar (1) ou localizarem-se entre as "cabeças" hidrofílicas (2 e 3). Moléculas com características anfífilas podem interagir com os grupos constituintes da região polar e intercalarem-se na região apolar. Ainda outras duas localizações são possíveis, no caso de moléculas com uma maior proporção lipófila e de moléculas não-polares. As primeiras podem ser inseridas a um nível mais profundo e as segundas no interior da micela (4 e 5). Devido ao carácter dinâmico apresentado por estas estruturas, a localização exibida por um soluto corresponde a uma posição média ao longo do tempo (Matos, 2001).

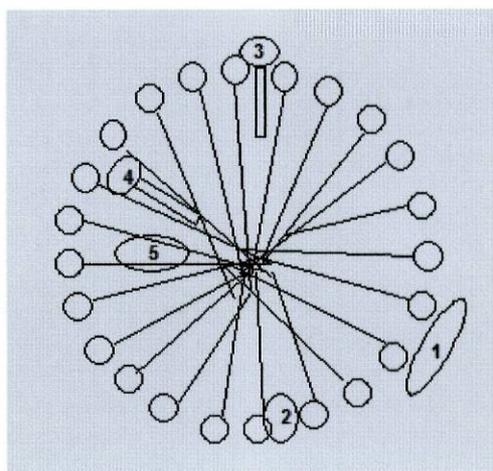


Figura 3.8. Representação esquemática de possíveis locais de ligação de solutos em micelas (Fonte: Matos, 2001).

3.2.2 Importância das micelas

A capacidade que as micelas apresentam para dissolver substâncias de diferentes polaridades tem importantes aplicações a nível biológico e a nível farmacêutico. Os detergentes naturais, como os sais biliares, fosfolípidos e glicosídeos esteróis, são importantes componentes de estruturas biológicas e desempenham funções fundamentais nos mecanismos de absorção e transporte de substâncias exógenas. Um passo limitante na absorção de fármacos muito lipossolúveis é a sua solubilidade

nos fluídos do tracto gastrointestinal, que é facilitada pela presença de micelas. Substâncias muito hidrossolúveis tendem a dissolver-se rapidamente, mas a difusão através da membrana é limitada, sendo adjuvada pela presença das micelas (Matos, 2001).

Das vantagens apresentadas pelos sistemas micelares podem ser enumeradas a sua fácil e rápida preparação, o facto de apresentarem uma estabilidade elevada e a sua potencial utilização em formulações farmacêuticas para alterar a biodisponibilidade de fármacos (Matos, 2001; Lopes, 1997). Apesar de, algumas desvantagens também poderem ser apontadas, nomeadamente a semelhança estrutural incompleta com os sistemas que se pretende mimetizar, as vantagens revelam-se compensadoras.

Na componente experimental, foram utilizadas como sistema simulador da biomembrana micelas de hexadecilfosfocolina (HDPC) cuja estrutura molecular se encontra seguidamente ilustrada (figura 3.9).

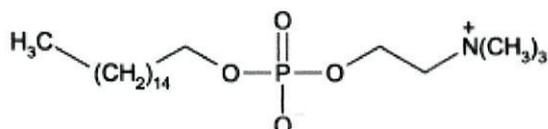


Figura 3.9. Estrutura molecular de uma micela de hexadecilfosfocolina (Fonte: <http://www.mcmaster.ca>)

3.3 Estruturas vesiculares: lipossomas

Os agentes anfílicos constituídos por um grupo hidrofílico ligado a duas cadeias hidrofóbicas apresentam a capacidade de, espontaneamente, formar agregados em bicamada, os quais assumem a forma de uma estrutura esférica e fechada quando dispersos em solução aquosa. Esta estrutura vesicular fechada envolve um determinado volume de solução aquosa, cuja dimensão está compreendida entre alguns nanómetros até micrómetros de diâmetro (Matos, 2001; Lasic, 1993).

As vesículas constituídas por fosfolípidos são designadas por lipossomas (Pramauro e Pelezetti, 1996 cit. Matos, 2001). Alec Banham e seus colaboradores, em 1965, descreveram os lipossomas (do grego *lipos* (gordura) e *sôma* (corpo) pela primeira vez como uma dispersão de fosfolípidos em água que produzia espontaneamente estruturas membranares fechadas (figura 3.10). Tais estruturas são constituídas por diversas camadas de fosfolípidos concêntricas, separadas por compartimentos aquosos (Matos, 2001). Os lipossomas constituem modelos fiáveis das biomembranas devido ao facto de apresentarem os seus constituintes principais e de também exibirem uma estrutura idêntica a estas.

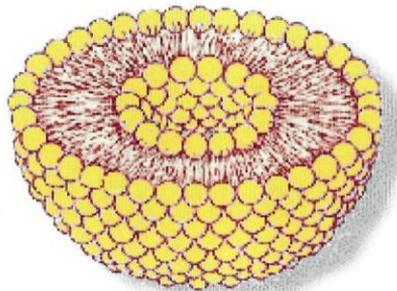


Figura 3.10. Representação esquemática da estrutura de um lipossoma. (Fonte: <http://www.saints.css.edu>)

Os lipossomas têm a capacidade de simular muitas das propriedades das biomembranas, constituindo ferramentas valiosas para o estudo da interacção xenobiótico-membrana. Devido à morfologia e à capacidade de intervir em fenómenos de transporte na bicamada fosfolipídica, a utilização de lipossomas como sistemas transportadores de fármacos tem sido largamente estudada (Matos, 2001).

3.3.1 Classificação e obtenção das vesículas

Na ausência de qualquer processamento adicional, a dispersão de fosfolípidos num excesso de água origina uma população polidispersa designada por vesículas multilamelares, as MLV (do inglês, *multilamellar vesicles*), cujas dimensões se encontram, normalmente, compreendidas entre 0,4 e 3,5 μm de diâmetro. Cada vesícula consiste em várias lamelas lipídicas dispostas concêntricamente, entre as quais se localiza uma fracção do meio aquoso interno. Os lipossomas formados por uma única camada são denominados vesículas unilamelares, designadas por LUV (do inglês, *large unilamellar vesicles*) se o seu tamanho estiver compreendido entre os 50 nm e 100 nm, ou por SUV (do inglês, *small unilamellar vesicles*) se o seu tamanho estiver compreendido entre os 25 e os 50 nm. Poder-se-ão ainda considerar as vesículas de tamanho intermédio, as IUV (do inglês *intermediate-sized unilamellar vesicles*) (Matos, 2001; Lasic, 1993).

O processo clássico de preparação de lipossomas, iniciado por Bangham em 1965, designa-se por método da hidratação do filme lipídico (Bangham, 1965 cit. Lasic, 1993). As principais fases do referido processo podem ser observadas na figura 3.11 e encontram-se descritas pormenorizadamente na secção 4.4 .

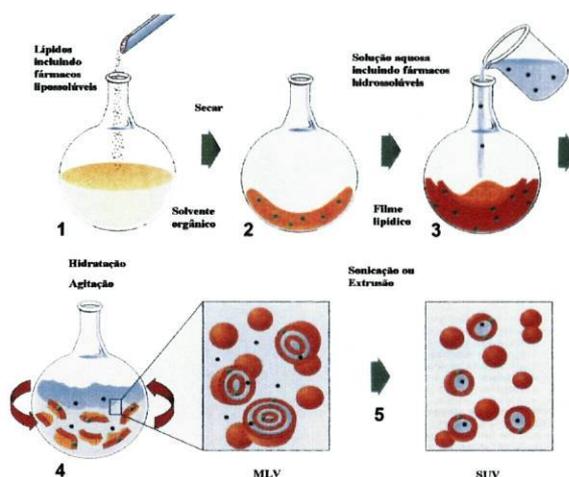


Figura 3.11. Representação esquemática da preparação de MLV: 1) dissolução do detergente num solvente orgânico; 2) formação do filme lipídico nas paredes do balão; 3) adição de uma solução aquosa ao filme lipídico; 4) agitação e obtenção dos MLV; 5) processamento dos MLV por extrusão ou sonicação conduzindo à formação de LUV. (Fonte: Matos, 2001)

O método de hidratação do filme lipídico pode sofrer algumas variações, nomeadamente, quanto ao solvente orgânico utilizado, à forma de secagem do detergente e aos parâmetros de agitação, como o tempo, a intensidade, o modo e a temperatura (Matos, 2001; Lasic, 1993). No entanto, a maioria destas variações promove a formação de MLV, muito heterogêneas relativamente ao tamanho e à forma, apresentando uma pequena percentagem de SUV e LUV (Hotani et al., 1999). Factores como a composição lipídica, a concentração, o processo de hidratação, a fase aquosa utilizada e o tempo de hidratação afectam a preparação obtida (Woodle e Papahadjopoulos, 1997 cit Matos, 2001).

Por tratamento mecânico, as MLV formadas podem ser convertidas noutras estruturas, como as SUV ou as LUV, sendo para isso utilizadas mais frequentemente a sonicação e a extrusão (Matos, 2001). O processo de sonicação, foi o primeiro método utilizado para homogeneizar dispersões de MLV, podendo ser efectuado utilizando um banho de ultra-sons ou uma sonda de ultra-sons em titânio, a qual é empregue quando uma maior energia é requerida (Jones e Chapman, 1995 cit. Matos, 2001).

O processo de extrusão consiste na passagem forçada com a ajuda de um gás inerte e pressão elevada (100 atm) das dispersões de MLV por um extrusor (figura 3.12), o qual possui filtros de diâmetro de poro bem definido. Os lípidos devem ser extrudidos a uma temperatura acima da temperatura de transição de fases (de gel a líquido) e ser submetidos a várias passagens através do filtro para garantir a homogeneidade de dimensão dos lipossomas (Matos, 2001). Extrusões repetidas permitem diminuir o número de lamelas e após dez passagens pelo filtro, os lipossomas obtidos são predominantemente unilamelares. O diâmetro final destas estruturas está dependente do tamanho do poro utilizado, bem como das características do próprio lípido (Matos, 2001; Lasic, 1993).

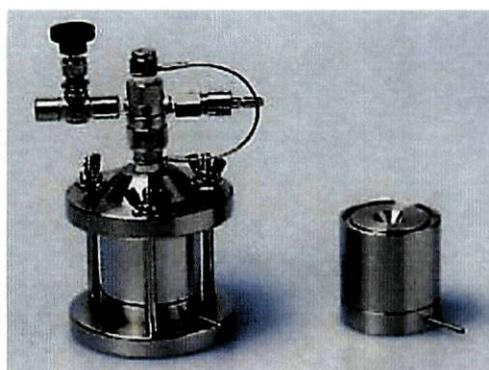


Figura 3.12. Extrusor utilizado na produção de lipossomas(Fonte: www.nutrition-paris5.org).

O tipo de lipossomas a preparar depende do objectivo dos estudos a realizar. Para estudos que envolvam a incorporação de fármacos lipossolúveis, os quais interactivam com a biomembrana lipídica, a concentração do lípido é um aspecto mais importante do que a dimensão dos lipossomas (Lasic, 1993).

3.3.2 Estabilidade das vesículas

A variação da função de Gibbs quando uma molécula anfifílica transita do meio aquoso para um ambiente hidrofóbico é considerável e explica a tendência dos lípidos para se organizarem na forma de bicamada, de modo a minimizar a interacção da água com as cadeias carbonadas (Oliveira, 1998 cit. Matos, 2001). A organização das moléculas em bicamadas tende a que o sistema adquira uma configuração termodinamicamente estável, com uma baixa energia livre. Neste sentido, os fosfolípidos orientam-se de forma a maximizar a superfície de exposição dos seus grupos polares face ao meio aquoso. A hidratação do filme lipídico, ilustrada na figura 3.13, induz a formação de bicamadas lipídicas, organizadas em estruturas tubulares que se alongam, podendo atingir cerca de 100 μm de comprimento. Durante esta fase, as bicamadas estabilizam a uma distância de equilíbrio que resulta do compromisso entre as forças repulsivas e atractivas. A agitação do sistema provoca o destacamento das estruturas tubulares, que se fecham e originam lipossomas (Matos, 2001; Lasic, 1993).

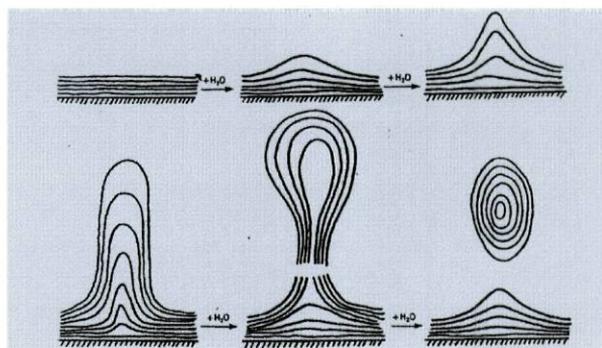


Figura 3.13. Representação esquemática da formação de MLV pela hidratação do filme lipídico (Fonte: Lasic, 1993).

O mecanismo de formação das vesículas permite a ocorrência de estruturas com formas esférica e oval. Estas últimas, com o decorrer do tempo, convertem-se progressivamente em estruturas esféricas, para as quais a energia de curvatura é mínima. Tal facto, poderá provavelmente ser atribuído ao movimento de "flip-flop" das moléculas fosfolipídicas entre as lamelas da bicamada (Matos, 2001).

O processo de formação dos lipossomas é influenciado por diversos parâmetros, tais como, a temperatura, a agitação, a composição lipídica, o pH, a força iónica e a osmolaridade da fase aquosa (Barbosa, 1995).

Com o decorrer do tempo os lipossomas podem sofrer alterações quer de natureza física, quer química (Lasic, 1993). Fisicamente, em conformidade com a sua constituição e com o meio envolvente, os lipossomas podem sofrer agregação, fusão, deposição, ruptura membranar ou, no caso de encapsularem solutos, perderem o seu conteúdo (Lasic, 1993). A nível químico, os fosfolípidos que constituem os lipossomas podem sofrer dois processos degenerativos: hidrólise e oxidação. A hidrólise, efectua-se na ausência de oxidantes específicos, via um mecanismo de radicais livres. A oxidação dos fosfolípidos ocorre preferencialmente em fosfolípidos poli-insaturados, como por exemplo a fosfatidilcolina (Grit e Crommelin, 1993^a cit. Matos, 2001). A presença de oxigénio, luz e elevadas temperaturas constituem aspectos que contribuem para intensificar o processo de hidrólise. O pH do meio é também um factor que influencia significativamente a hidrólise, verificando-se um efeito mínimo para o valor de pH próximo de 6,5. Um aumento de hidrólise, catalizada por ácido ou por base, verifica-se para valores de pH inferiores e superiores. Por último, a temperatura também constitui igualmente um factor promotor de hidrólise (Matos, 2001).

Os lipossomas utilizados como sistema simulador da biomembrana no trabalho desenvolvido foram lipossomas de fosfatidilcolina de gema de ovo (EPC). A figura seguinte ilustra a estrutura molecular do referido lípido (figura 3.14).

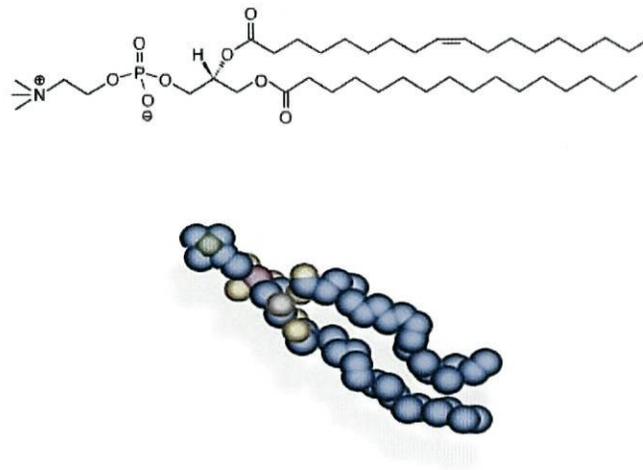


Figura 3.14. Representação esquemática da estrutura molecular de uma fosfatidilcolina (Fonte: <http://www.avantilipids.com> e <http://www.reseauproteus.net>)

3.4 Micelas e lipossomas como modelos membranares

A similaridade entre agregados auto-organizados, como micelas e lipossomas, e as biomembranas (figura 3.15) tem despertado a atenção dos investigadores ao longo do tempo. Estes micro-agregados, em especial os lipossomas, apresentam a anisotropia e a organização estrutural observada nas membranas biológicas. Os lipossomas constituem um modelo mais fiel da biomembrana do que uma micela, devido à sua estrutura em bicamada. No entanto, estudos efectuados com diferentes substâncias mostram que se obtêm resultados muito semelhantes na determinação de valores de coeficiente de partilha, quer usando micelas quer lipossomas (Castro *et al.*, 2001a; Castro *et al.*, 2001b).

As micelas e os lipossomas podem ser fácil e homogeneamente preparados e as suas propriedades físicas bem caracterizadas. Outro aspecto a ter em consideração, é o facto de apresentarem maior reprodutibilidade do que a utilização de células ou tecidos animais (Matos, 2001).

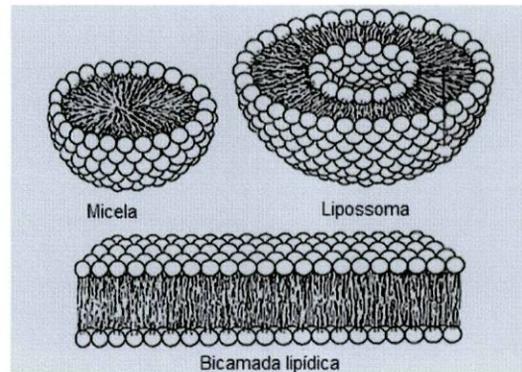


Figura 3.15. Representação esquemática comparativa das diferentes morfologias estruturais (Fonte: <http://www.cu.lu>)

Na componente experimental foram desenvolvidos estudos de alguns parâmetros físico-químicos que visaram compreender e caracterizar o comportamento de xantonas mono-hidroxiladas. Neste sentido, procedeu-se à determinação do coeficiente de partilha, à avaliação da fluidez membranar e à avaliação das interações electrostáticas para as referidas substâncias.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho incidiu fundamentalmente na determinação de valores de log P de xantonas mono-hidroxiladas no sistema octanol/água e em micelas de hexadecilfoscolina (HDPC).

Posteriormente, foram ainda realizados estudos de avaliação da fluidez membranar e interacções electrostáticas em lipossomas de fosfatidilcolina de gema de ovo (EPC).

4.1 Reagentes, soluções e equipamento

4.1.1 Reagentes e soluções

As xantonas foram sintetizadas no laboratório do serviço de Química Orgânica da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, com excepção da xanten-9-ona que foi adquirida à Sigma, com um grau de pureza de 97%.

A hexadecilfosfocolina (HDPC), com um grau de pureza superior a 98%, e a fosfatidilcolina da gema do ovo (EPC), com um grau de pureza de 99,8%, foram adquiridas à Sigma-Aldrich no estado sólido e utilizadas sem purificação adicional.

O octanol, de pureza *p.a.*, foi adquirido à Sigma- Aldrich.

A sonda fluorescente 6-AS foi adquirida à Molecular Probes.

Todos os outros reagentes utilizados foram de pureza *p.a.* e foram adquiridos à Merck.

Todas as soluções aquosas foram preparadas com água bidesionizada (condutividade inferior a 0,1 μScm^{-1}).

Cada uma das xantonas em estudo foi pesada rigorosamente e posteriormente dissolvida em solução aquosa de dimetilsulfóxido (DMSO) a 1%, de modo a se obterem soluções com a concentração final de 2mM.

A hexadecilfosfocolina (HDPC), foi pesada rigorosamente e posteriormente dissolvida em solução tampão Hepes (pH 7,4), de modo a se obterem soluções com a concentração final de 3mM.

A solução de sonda fluorescente sonda 6-AS, foi preparada por pesagem rigorosa de 0,5 mg de reagente ácido-6-(9-antróiloxi)-esteárico e posteriormente dissolvida em etanol a 2% num volume final de 2mL. Após a sua preparação, a solução foi conservada a 0°C.

4.1.2 Equipamento

- Extrusor (Lipex Biomembranes Inc., Vancouver, Canada), equipado com filtros de policarbonato de diâmetros de poro de 100 nm (Nuclepore Corp., Pleasanton, CA, USA)
- Espectrofotómetro UV/Vis Cary Varian100
- Fluorímetro Perkin Elmer LS 50
- Malvern Zeta Sizer 5000 (Malvern LTD, Malvern, UK)
- Vórtex Hridolph, REAX-2000
- Ultra-sons Bandelin Sonorex RK 100H
- Centrífuga Heraeus, Labofuge Ae
- Balança AND, GR-202
- "pH meter" GPL 22
- Mili-Q, RG

4.2 Sistema octanol/água

O coeficiente de partilha em octanol/água, foi determinado pelo método de agitação em balão (*shake flask method*) de acordo com a descrição da OCDE Guidelines (1995).

Inicialmente, procedeu-se à saturação das fases aquosa e hidrofóbica (n-octanol) durante um período de 24 horas sob agitação mecânica a 25°C.

Para quantificar a xantona na fase hidrofóbica foram preparadas cinco soluções padrão, por diluição da solução inicial de xantona (2mM), compreendendo um intervalo de concentrações entre 10 μ M e 60 μ M. Igualmente, para a fase aquosa, foram preparadas cinco soluções padrão, com as mesmas concentrações e nas condições anteriores.

A preparação das amostras foi efectuada utilizando o n-octanol previamente saturado em água:

- 3mL de solução aquosa de xantona : 3mL de octanol (1:1, v/v);
- 2mL de solução aquosa de xantona: 4 mL de octanol (1:2, v/v);
- 4mL de solução aquosa de xantona: 2mL de octanol (2:1, v/v).

As amostras foram submetidas a agitação, em ultra-sons, durante 10 minutos, a 25°C. Seguidamente, foram centrifugadas a 4500 rpm, durante 10 minutos. A quantificação das xantonas em ambas as fases, aquosa e oleosa, foi efectuada por espectrofotometria UV/Vis , tendo sido determinadas as absorvências em 267 nm para a xanten-9-ona, em 280 nm para a 1-hidroxixantona e para a 4-hidroxixantona, em 305 nm para a 3-hidroxixantona e em 368 nm para a 2-hidroxixantona. Os valores de comprimentos de onda (λ) correspondem aos máximos de absorção de cada uma das xantonas.

Sob as condições experimentais anteriormente descritas, foram ainda realizados ensaios utilizando como solvente uma solução de tampão acetato de sódio de pH 5.

4.3 Sistema micelar HDPC/tampão

Os coeficientes de partilha em HDPC/Hepes para as xantonas estudadas foram determinados a pH 7,4. Este valor de pH foi assegurado pela utilização de solução tampão Hepes, (N-[2-Hidroxietil] piperazina-N'-[2-ácido etanosulfónico]), a 10 mM, e cuja força iónica foi ajustada através da adição de 100 mL de cloreto de sódio (NaCl) a 0,1 M para um volume final de 1000mL.

Para cada ensaio, foram preparadas duas séries de soluções, amostras e duplicados, às quais foram adicionadas concentrações crescentes de HDPC e DMSO a 1% (15 μ L). Para todas as soluções foram adicionados volumes decrescentes de solução tampão Hepes (pH 7,4) e, concentração e volume fixos (15 μ L) da xantona em estudo. Seguidamente, após agitação em vortéx, as soluções foram submetidas a um período de incubação (30 minutos) ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. Terminado este tempo, procedeu-se à leitura das absorvências.

Os espectros de absorvência, registados num intervalo de comprimentos de onda compreendido entre 200 e 450nm, foram obtidos num espectrofotómetro de duplo feixe, com compartimento da célula termostaticado a 25°C, em intervalos de 1nm, utilizando células de quartzo de 1cm de percurso óptico, a uma velocidade de varrimento de 800 nm/min. Os espectros foram obtidos usando como comparação uma solução tampão Hepes.

Com o auxílio de um programa informático (Origin 6.1), foram calculadas a segunda derivada dos espectros de absorvência obtidos.

4.4 Preparação dos lipossomas de EPC

A preparação dos lipossomas seguiu o método clássico de hidratação do filme lipídico (Lasic, 1993). A quantidade necessária de fosfatidilcolina de gema de ovo (EPC), foi dissolvida em clorofórmio-metanol (9:1), evaporada até à secura num balão de vidro, sob corrente de azoto, em rotação permanente para dispersar nas paredes do balão a EPC de forma fina e homogénea. Posteriormente, o filme lipídico formado foi hidratado com a fase aquosa constituída por solução tampão Hepes, a pH 7,4, em quantidade suficiente para a obtenção de uma concentração final de 10 mM em EPC .

A extrusão foi efectuada num extrusor a 250 bar, em corrente de azoto. Os filtros de policarbonato utilizados tinham diâmetros de poro de 100 nm. Para preparar LUV com diâmetro aproximado de 100 nm, a suspensão foi extrudida dez vezes no mesmo filtro, originando no final uma suspensão com uma tonalidade azulada e de aspecto translúcido.

Após o processo de extrusão adicionaram-se de forma faseada, 500 µL de sonda (5µM) à solução de lipossomas, agitando no vortéx entre cada adição. Seguidamente esta solução com sonda incorporada foi submetida a uma incubação, ao abrigo da luz, durante 30 minutos e à temperatura ambiente.

4.5 Doseamento do fósforo

O doseamento de fósforo teve como objectivo a determinação da concentração real de EPC nas amostras, de acordo com o método do fosfomolibdato modificado ou método de Bartlett (New, 1990). Este doseamento é justificado devido à existência de perdas de lípido aquando o processo de fabrico dos lipossomas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Coeficiente de partilha no sistema octanol/água

A interacção de xenobióticos com a camada lipídica das biomembranas tem sido o objectivo de variados estudos quer teóricos quer experimentais (Davis *et al.*, 1997). O carácter lipofílico de uma molécula é um aspecto de extrema importância, especialmente na avaliação do comportamento de uma dada substância em sistemas biológicos e ambientais.

Um parâmetro que permite avaliar a lipofilicidade é o coeficiente de partilha (P), característico para cada estrutura molecular (Macri *et al.*, 2003). O coeficiente de partilha pode ser determinado utilizando o sistema clássico octanol/água e por sistemas que recorrem a micelas e a métodos espectrofotométricos de segunda derivada no UV/Vis (Rodrigues *et al.*, 2001).

A forma como as moléculas atravessam as biomembranas tem sido objecto de estudo desde os primeiros trabalhos de Overton em 1899, os quais conduziram à "Regra de Overton". Segundo esta regra, os coeficientes de permeabilidade estão correlacionados com os coeficientes de partilha óleo/água (Sangster, 1997). Devido ao facto de o n-octanol apresentar uma extensa zona apolar ("cauda"), o sistema octanol/água é um sistema de referência para compreender o processo de partilha entre os meios orgânico e aquoso (Mazzobre *et al.*, 2005).

O coeficiente de partilha octanol/água, a uma temperatura específica, consiste na razão entre a concentração de uma substância na fase orgânica (n-octanol) e na fase aquosa (água). A sua expressão matemática é a seguinte:

$$P = \log \left(\frac{[A]_{\text{oct}}}{[A]_{\text{aq}}} \right) \quad (5.1)$$

onde P, $[A]_{\text{oct}}$ e $[A]_{\text{aq}}$, representam respectivamente o coeficiente de partilha e as concentrações de substância na fase orgânica e aquosa.

Este sistema é designado também por *shake flask method* ou “método da agitação em balão” o qual se baseia fundamentalmente na agitação de uma solução aquosa de concentração conhecida de uma substância com um volume conhecido de fase orgânica, até que o sistema atinja o equilíbrio. Após o estabelecimento do equilíbrio, a substância em estudo é quantificada em ambas as fases, aquosa e orgânica, recorrendo a métodos analíticos como a espectrofotometria do UV/Vis ou a cromatografia HPLC (Saghaie, 2003). A descrição do procedimento para a realização do método de agitação em balão encontra-se pormenorizadamente descrita pela OCDE (1995).

O coeficiente de partilha enquanto fenómeno físico-químico foi observado pela primeira vez por Berthelot (Berthelot e Jungfleish, 1872) e por Nernst (1891). O aproveitamento desta propriedade físico-química na correlação com a acção biológica de substâncias orgânicas foi avaliada e desenvolvida por Rekker (Rekker e Mannhold, 1992) e ainda por Hansch e Leo (1995).

As xantonas objecto deste estudo foram: a 1-hidroxixantona, a 2-hidroxixantona, a 3-hidroxixantona, a 4-hidroxixantona e a xanten-9-ona (figura 2.2).

Os resultados do coeficiente de partilha obtidos neste estudo utilizando o sistema octanol/ água encontram-se apresentados na tabela 5.1. Os valores descritos são a média e desvio-padrão de quatro ensaios experimentais independentes. Os valores de log P obtidos utilizando como fase aquosa uma solução tampão acetato de sódio, de pH 7,4 são menores do que os valores obtidos utilizando como fase aquosa uma solução tampão de acetato de sódio, de pH 5,0 (tabela 5.3). Com base nos valores de pKa (de 9,15 a 9,23) determinados por Wu *et al.* (2004), para xantonas de origem natural e, admitindo a semelhança estrutural das xantonas estudadas e consequentemente as semelhanças das características ácido-base, possivelmente poder-se-á assumir que as moléculas encontram-se na forma protonada (neutra) para o referido valor de pH (pH 5,0).

A introdução de um grupo polar na estrutura da xanten-9-ona, como o grupo hidroxilo, aumenta a polaridade da molécula. Consequentemente, a molécula mais hidrofílica apresenta uma menor lipofilicidade ($< \text{Log P}$). Desta forma, todos os factores que possam contribuir para a estabilização de eventuais dipolos que se formem, favorecerão a solubilidade em água e assim, contribuirão para a diminuição do valor de log P.

A presença de um grupo hidroxilo em C-1 possibilita a formação de uma ponte de hidrogénio intramolecular (figura 5.1). Consequentemente, a possibilidade de se estabelecerem pontes de hidrogénio com a água é mais reduzida sendo a hidrofília da molécula também diminuída. A ponte de hidrogénio intramolecular tem ainda como consequência a diminuição da polarização do grupo carbonilo, o que contribui para a menor hidrofílicidade da molécula. Desta forma, justifica-se que o valor de log P determinado para a 1-hidroxixantona seja mais elevado do que o valor de log P encontrado para o núcleo base xantónico (xanten-9-ona). Os valores de log P calculados pelos programas "CLOGP", "KOWWIN" e "IAlogP" (www.daylight.com/daycgi/clogp, www.syrres.com/esc/est_kowdemo.htm e www.ingentaconnect.com/content/ben/mrnc/2003/00000003/00000008/art00005) corroboram este raciocínio apresentando valores de log P para a 1-hidroxixantona semelhantes ou superiores ao da xanten-9-ona (tabela 5.1).

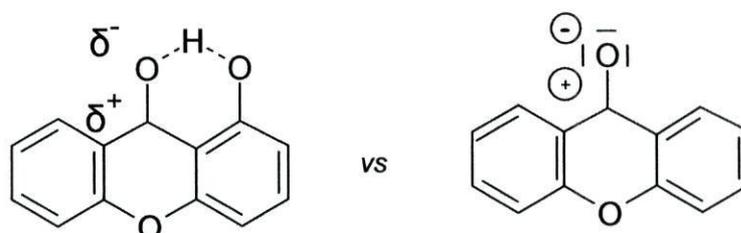


Figura 5.1. Ponte de Hidrogénio estabelecida na xanten-9-ona.

Tabela 5.1. Comparação dos valores de log P experimentais e teóricos.

	Octanol/água	CLOGP	KOWWIN	IAlogP
xantona	1,08	2,98	8,84	3,25
1-hidroxixantona	1,29	3,61	4,14	3,24
2-hidroxixantona	1,09	2,71	3,36	3,18
3-hidroxixantona	0,72	2,71	3,36	3,24
4-hidroxixantona	0,63	2,71	3,36	3,16

A 2-hidroxixantona corresponde a um dipolo estabilizado por ressonância. A figura 5.2 representa quatro contribuintes em equilíbrio de ressonância. Todas as estruturas de ressonância mostram a presença de ligações duplas conjugadas, facto que contribui

para a estabilidade, favorece o equilíbrio representado e concorre para a polarização da molécula. Contudo, estas duas últimas contribuições são ainda mais significativas nas restantes estruturas xantónicas também estabilizadas por ressonância.

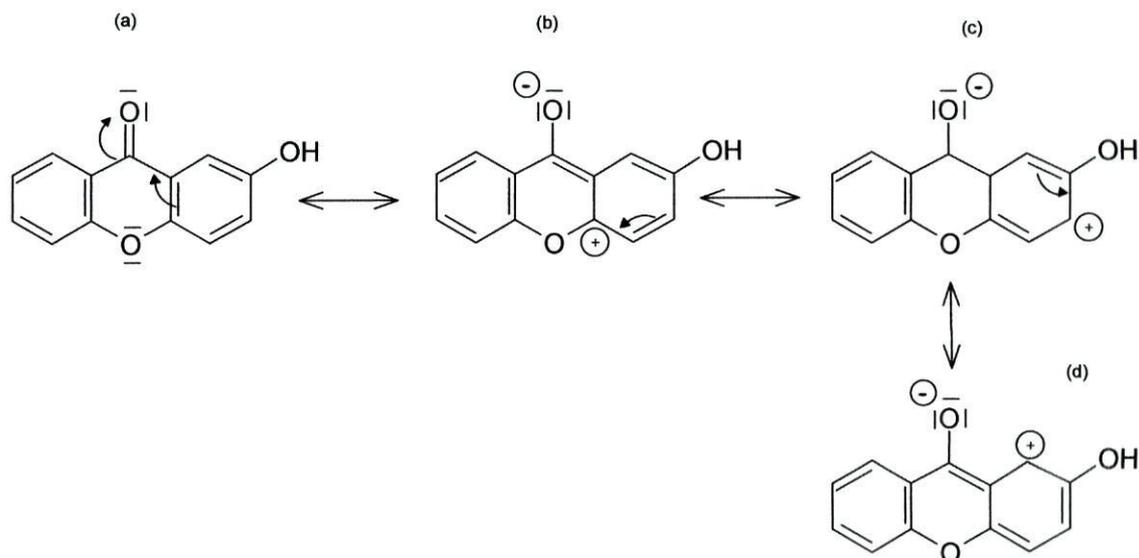


Figura 5.2. Estruturas de ressonância estabelecidas na 2-hidroxi-xantona.

Das xantonas estudadas a 3-hidroxi-xantona é a mais ácida, apresentando tendência em ceder o próton hidroxílico mais facilmente. A figura 5.3 (d), mostra a carga positiva directamente no átomo de oxigénio electronegativo. Este facto contribui para a estabilização da carga positiva e conseqüentemente, para a polarização da molécula. Deste modo, explica-se que o valor de log P determinado para a 3-hidroxi-xantona seja inferior ao valor de log P da 2-hidroxi-xantona. Comparando estas duas xantonas, verifica-se que a diferença reside no facto de que na 2-hidroxi-xantona nenhum dos contribuintes apresenta carga positiva sob a influência directa de um átomo electronegativo capaz de diminuir o efeito dessa carga. De acordo com este raciocínio, é então compreensível que a 3-hidroxi-xantona, em relação à 2-hidroxi-xantona, apresente uma maior tendência para estar polarizada.

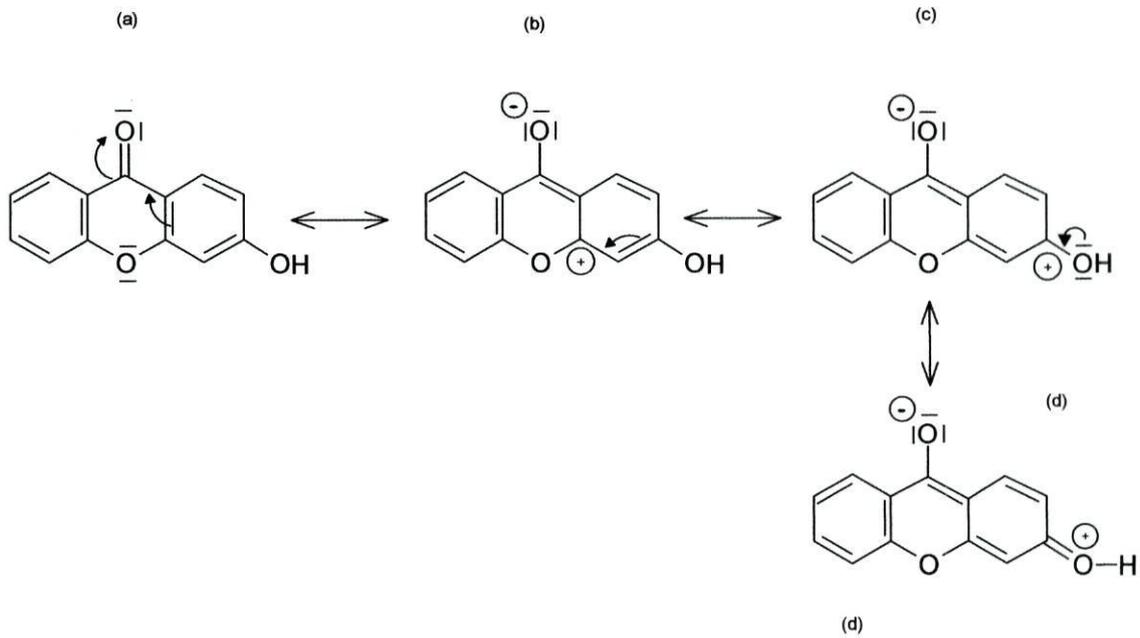


Figura 5.3. Estruturas de ressonância estabelecidas na 3-hidroxixantona.

Por último, a 4-hidroxixantona, apresenta uma das estruturas de ressonância (figura 5.4 (b)) com uma carga positiva flanqueada por um átomo de oxigênio electronegativo e um grupo hidroxilo dador de electrões. Quer o heteroátomo de oxigênio, quer o efeito indutivo positivo do grupo hidroxilo contribuem para suportar melhor a carga positiva do átomo de carbono. Estes dois aspectos podem justificar a maior estabilidade do dipolo, o favorecimento da polarização da molécula e a conseqüente menor lipofilicidade, quando comparada com as outras xantonas hidroxiladas estudadas.

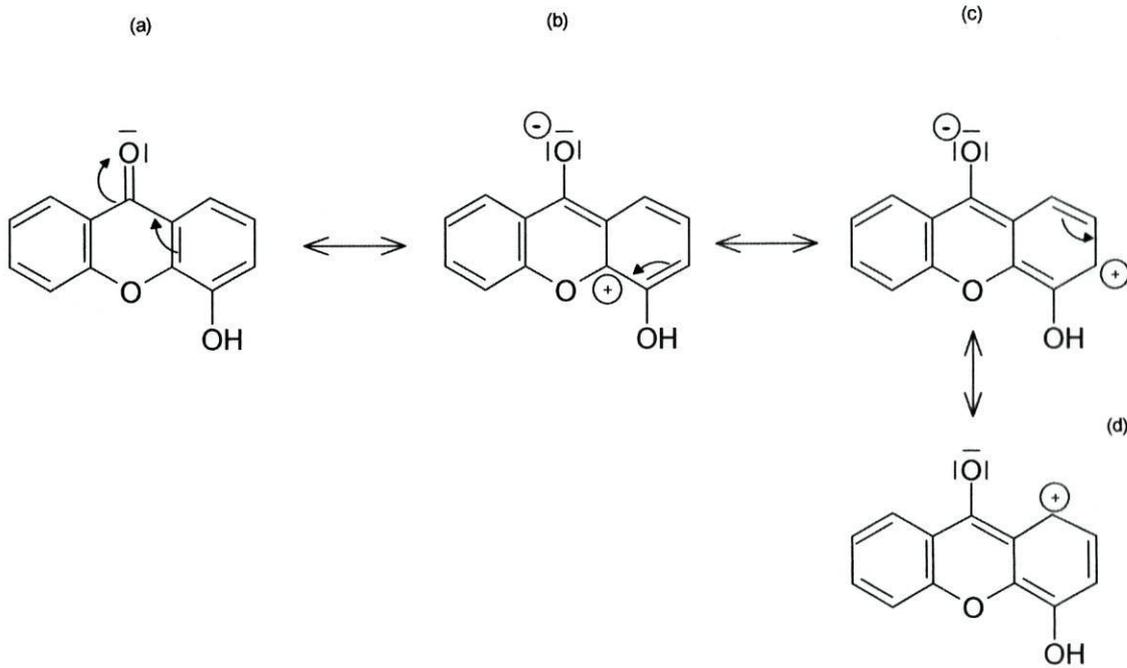


Figura 5.4. Estruturas de ressonância estabelecidas na 4-hidroxi-xantona.

5.2 Coeficientes de partilha no sistema micela/tampão

Numa solução aquosa estabelece-se um equilíbrio de partilha das diferentes espécies presentes em solução. Assim, por exemplo, para um ácido (AH), a forma protonada (neutra) e desprotonada (negativa), em presença de uma segunda fase, como um solvente imiscível, ou micro-agregados, tais como, lipossomas ou micelas, partilham entre as duas fases com coeficientes de partilha diferentes de acordo com as suas características de solubilidade em cada uma destas fases (figura 5.5) (Castro *et al.*, 2001a).

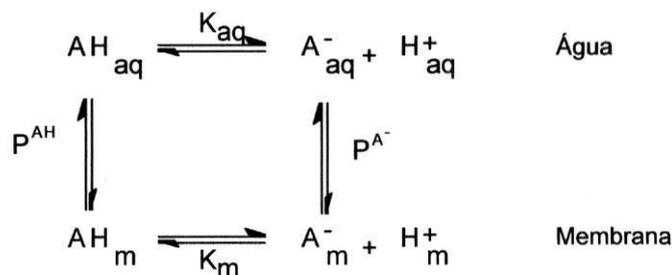


Figura 5.5. Diagrama de distribuição das espécies neutra (AH) e desprotonada (A⁻) de um ácido fraco, segundo o modelo de partilha proposto. (Fonte: Castro *et al.*, 2001)

O coeficiente de partilha (P) é expresso pela relação de concentrações da substância ([A]) na fase membrana (m) e na fase aquosa (aq). Onde, n_m , n_{aq} , V_m e V_{aq} representam o número de moles e os volumes de substância na membrana e na solução aquosa, respectivamente. P é obtido pela seguinte expressão:

$$P = \frac{[A]_m}{[A]_{aq}} = \frac{\frac{n_m}{V_m}}{\frac{n_{aq}}{V_{aq}}} \quad (5.2)$$

em que $[A]_m$ representa a concentração de substância ligada, considerando o volume de detergente e $[A]_{aq}$ concentração de substância livre em solução, para um determinado volume de solução aquosa.

Em termos de fracção molar de substância ligada (θ) (Wenk *et al.*, 1996 *cit.* Matos, 2001) o coeficiente de partilha (P) pode também ser expresso :

$$P = \frac{\frac{\theta}{V_m}}{\frac{(1-\theta)}{V_{aq}}} \quad (5.3)$$

O valor de θ pode ser obtido a partir das intensidades de absorvência (Abs) pela seguinte relação, onde $[A]_m$ representa a concentração de substância inserida na membrana (considerando o volume total de solução) e $[A]_T$ corresponde à concentração total de substância. Abs_{aq} , corresponde à absorvência da solução sem detergente; Abs_f , ao sinal correspondente a cada uma das soluções com diferentes concentrações de detergente e, Abs_m , a absorvência calculada para quando toda a substância se encontra em interacção com a membrana.

$$\theta = \frac{[A]_m}{[A]_T} = \frac{Abs_{aq} - Abs_f}{Abs_{aq} - Abs_m} \quad (5.4)$$

De referir ainda que a concentração total de substância, $[A]_T$, resulta da soma das concentrações da substância ligada, $[A]_m$, e livre, $[A]_{aq}$:

$$[A]_T = [A]_{aq} + [A]_m \quad (5.5)$$

Relacionando as equações equações 5.4 e 5.5 é possível obter-se a seguinte expressão:

$$P = \frac{Abs_{aq} - Abs_f}{\left((Abs_{aq} - Abs_m) - (Abs_{aq} - Abs_f) \right) \times \frac{V_m}{V_{aq}}} \quad (5.6)$$

Através de operações algébricas simples, e como $V_m/V_a \approx [M] \cdot V_\phi$, sendo $[M]$ a concentração de detergente, considerando o volume total, e V_ϕ o volume molar do detergente, obtém-se:

$$Abs_f = Abs_{aq} \frac{(Abs_m - Abs_{aq}) P [M]}{1 + P [M]} \quad (5.7)$$

Onde Abs_f , Abs_{aq} , Abs_m , P e M representam, respectivamente, as absorvências final, nas fases aquosa e membranar, o coeficiente de partilha e a concentração de detergente.

Em condições de validade da lei de Lambert-Beer-Bourguer, a absorvência (Abs) de uma solução é proporcional à concentração total de substância, que partilha entre duas fases, membranar (m) e aquosa (aq):

$$Abs = [A]_{aq} \epsilon_{aq} + [A]_m \epsilon_m \quad (5.8)$$

Onde, $[A]_{aq}$ e $[A]_m$ representam as concentrações da substância livre em solução e ligada à membrana, expressas em relação ao volume total de solução. A absorvidade molar da substância em solução aquosa e na membrana, são representados, respectivamente, por ϵ_a e ϵ_m (Matos, 2001).

Em espectrofotometria do UV/Vis alterações na absorvidade molar (ϵ) ou no comprimento de onda máximo (λ_{\max}) de absorção podem indicar que uma substância está a interagir com um meio com diferentes polaridades. Estas alterações podem ser usadas para determinar o valor do coeficiente de partilha (P) (Castro *et al.*, 2001a).

No entanto, podem ocorrer interferências espectroscópicas devido à dispersão da luz (Santos *et al.*, 2003). A presença de partículas em suspensão interferem com a luz incidente pelo que a dispersão da luz é um aspecto importante em análise espectrofotométrica de amostras farmacêuticas e biológicas. A dispersão de Rayleigh, ocorre quando as partículas são pequenas relativamente ao comprimento de onda (λ) e é inversamente proporcional à quarta potência de λ ; o segundo tipo de dispersão, a dispersão de Tyndall, ocorre quando as partículas são grandes e é inversamente proporcional ao quadrado de λ (Owen, 1998 *cit.* Matos, 2001).

A espectrofotometria derivativa é uma técnica analítica de grande utilidade para a obtenção de informação qualitativa e quantitativa a partir de espectros de substâncias com bandas não resolvidas (Ojeda, 2004; Matos, 2001).

A vantagem desta técnica face à clássica espectrofotometria reside no facto de possibilitar uma melhor resolução de sinais espectrais por diminuição da amplitude das bandas. A sua aplicação estende-se a análises variadas tais como, inorgânicas, orgânicas, farmacêuticas e ambientais (Ojeda, 2004; Matos, 2001).

A desvantagem da espectrofotometria derivativa é a diminuição da razão sinal/ruído, a qual se acentua com o aumento da ordem de derivação. Contudo, tal inconveniente pode ser atenuado com a regularização (*smoothing*) dos espectros derivados (Rojas *et al.*, 1988).

A presença de pontos isobésticos é indicativa de que as moléculas estudadas se encontram presentes na solução em pelo menos duas formas espectralmente distintas, livre e ligada à micela (Kitamura *et al.*, 1995). A existência destes pontos na derivada de segunda ordem dos espectros de absorvência indicam ainda uma completa eliminação do ruído de fundo, assegurado pela espectrofotometria derivativa (Pola *et al.*, 2004).

O processo de determinação de valores de coeficientes de partilha por espectrofotometria no ultravioleta, foi determinado utilizando como sistema mimético

da biomembrana, micelas de hexadecilfosfolina (HDPC). A concentração total de detergente ($[M]_T$) foi subtraída da concentração micelar crítica ($[M] = [M]_T - \text{cmc}$). A cmc para este detergente assumida em todos os ensaios foi $1,0 \times 10^{-5}$ M (Araujo *et al.*, 1979 *cit.* Matos, 2001).

Seguidamente apresentam-se os espectros de absorvência para cada uma das xantonas. Apresentam-se também os gráficos da derivada da absorvência, num determinado comprimento de onda em função da concentração de hexadecilfosfolina (HDPC), bem como as curvas de ajuste da equação 5.7 aos dados obtidos.

A observação dos espectros de absorvência das diferentes xantonas estudadas (figuras 5.6 (A) a 5.10 (A)) mostram máximos de absorvência em 253 nm, 256 nm, 335 nm, 249 nm e 264 nm, para a 1-hidroxixantona, 2-hidroxixantona, 3-hidroxixantona, 4-hidroxixantona e xanten-9-ona, respectivamente.

A presença de pontos isobéticos podem ser observados nas segundas derivadas dos espectros de absorvência de cada xantona estudada (figuras 5.6(B) a 5.10 (B)).

Os coeficientes de partilha das xantonas, foram determinados a partir da segunda derivada dos espectros de absorvência (figuras 5.6 (C) a 5.10 (C)).

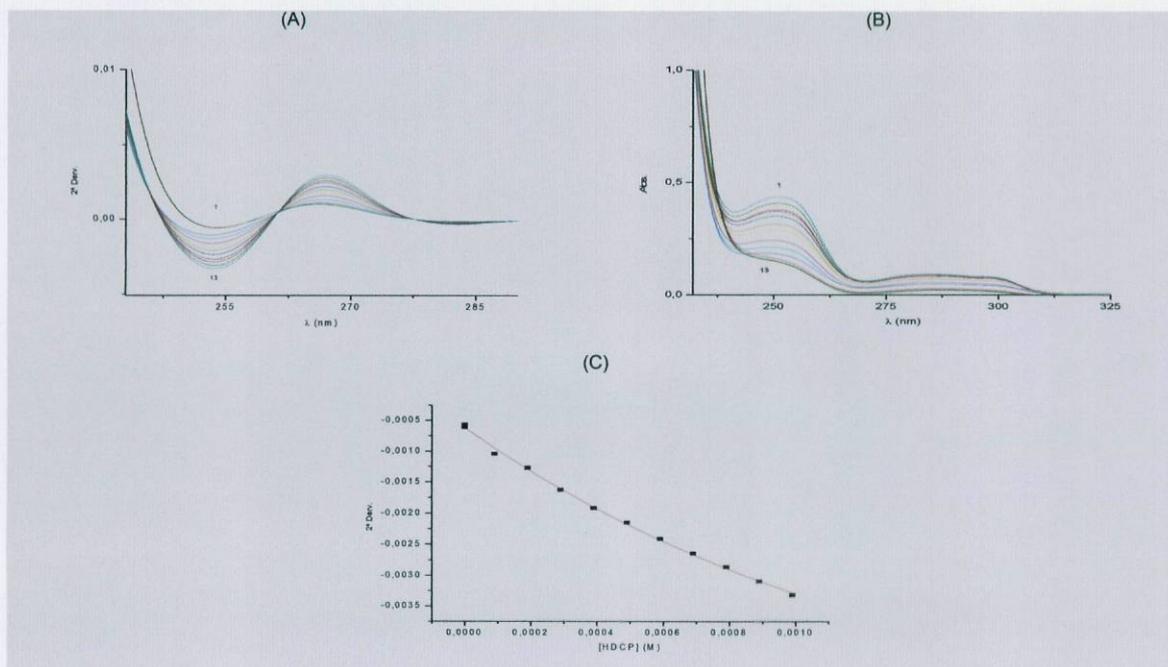


Figura 5.6 Espectros da absorvência (A), segunda derivada do espectro de absorvência (B) e do valor da segunda derivada em função da concentração de HDPC (C); (M): (1,2,3) 0; (4) $9,0 \times 10^{-5}$; (5) $1,9 \times 10^{-4}$; (6) $2,9 \times 10^{-4}$; (7) $3,9 \times 10^{-4}$; (8) $4,9 \times 10^{-4}$; (9) $5,9 \times 10^{-4}$; (10) $6,9 \times 10^{-4}$; (11) $7,9 \times 10^{-4}$; (12) $8,9 \times 10^{-4}$; (13) $9,9 \times 10^{-4}$ para a 1-hidroxixantona.

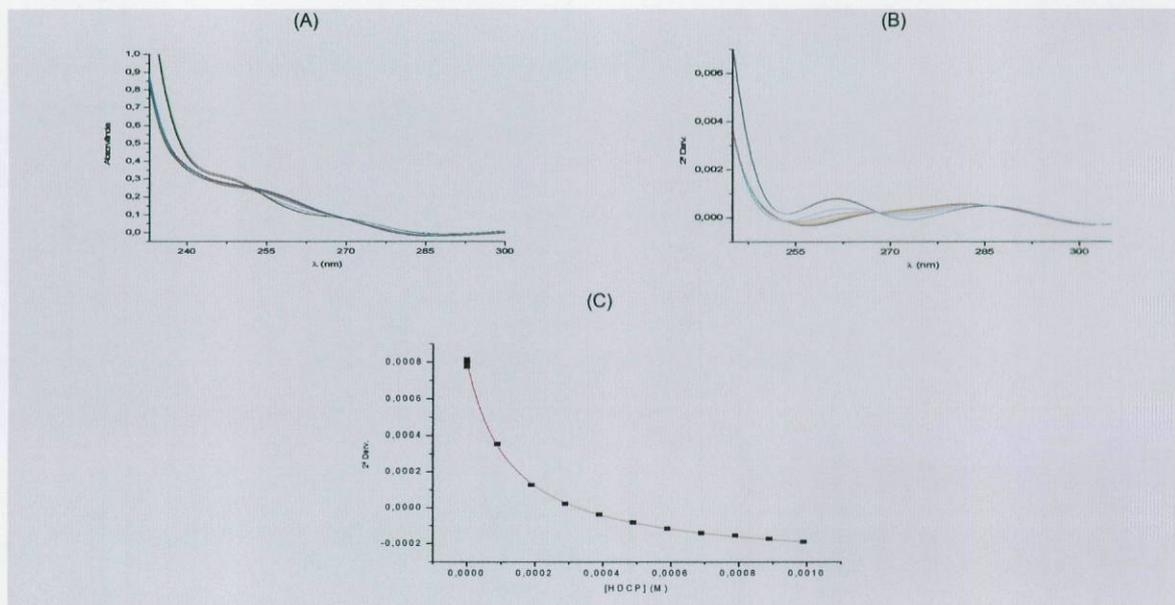


Figura 5.7 Espectros da absorvência (A), segunda derivada do espectro de absorvência (B) e do valor da segunda derivada em função da concentração de HDPC (C); (M): (1,2,3) 0; (4) 9.0×10^{-5} ; (5) 1.9×10^{-4} ; (6) 2.9×10^{-4} ; (7) 3.9×10^{-4} ; (8) 4.9×10^{-4} ; (9) 5.9×10^{-4} ; (10) 6.9×10^{-4} ; (11) 7.9×10^{-4} ; (12) 8.9×10^{-4} ; (13) 9.9×10^{-4} para a 2-hidroxixantona.

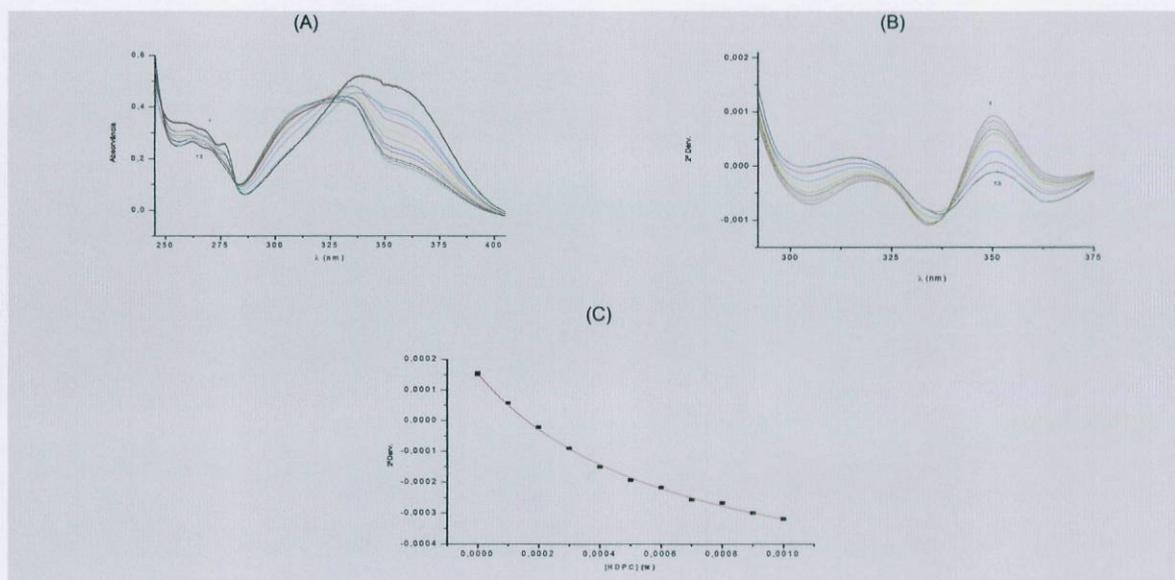


Figura 5.8 Espectros da absorvência (A), segunda derivada do espectro de absorvência (B) e do valor da segunda derivada em função da concentração de HDPC (C); (M): (1,2,3) 0; (4) 9.0×10^{-5} ; (5) 1.9×10^{-4} ; (6) 2.9×10^{-4} ; (7) 3.9×10^{-4} ; (8) 4.9×10^{-4} ; (9) 5.9×10^{-4} ; (10) 6.9×10^{-4} ; (11) 7.9×10^{-4} ; (12) 8.9×10^{-4} ; (13) 9.9×10^{-4} para a 3-hidroxixantona.

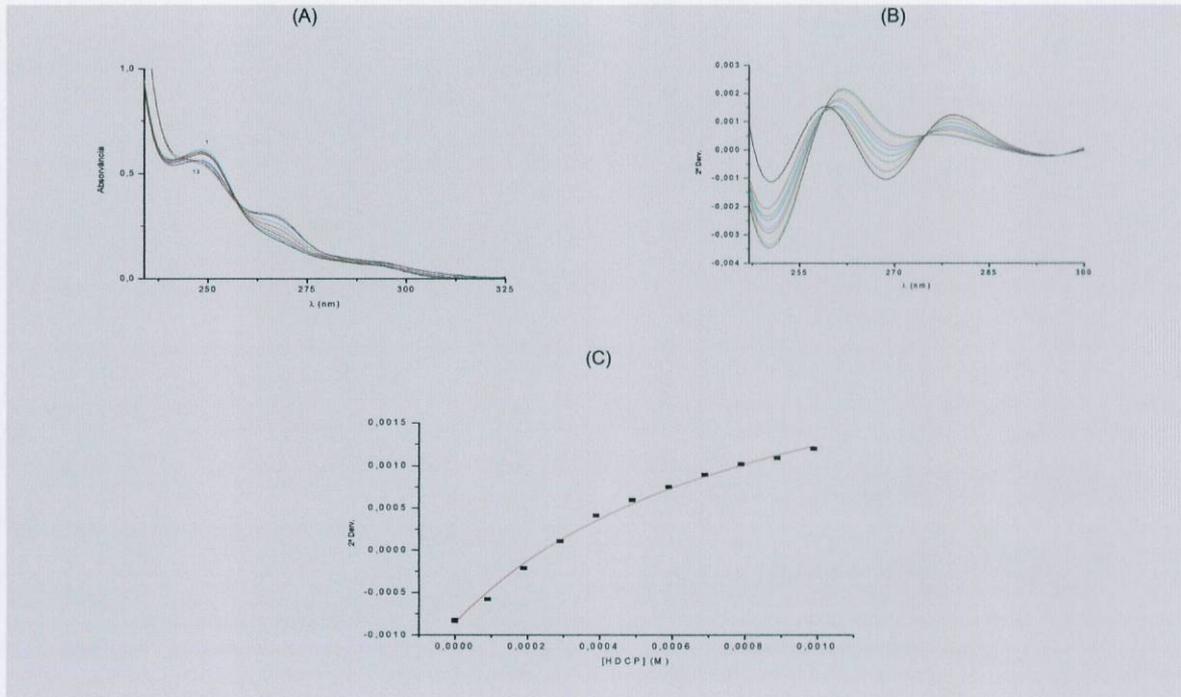


Figura 5.9 Espectros da absorvência (A), segunda derivada do espectro de absorvência (B) e do valor da segunda derivada em função da concentração de HDPC (C); (M): (1,2,3) 0; (4) 9.0×10^{-5} ; (5) 1.9×10^{-4} ; (6) 2.9×10^{-4} ; (7) 3.9×10^{-4} ; (8) 4.9×10^{-4} ; (9) 5.9×10^{-4} ; (10) 6.9×10^{-4} ; (11) 7.9×10^{-4} ; (12) 8.9×10^{-4} ; (13) 9.9×10^{-4} para a 4-hidroxixantona.

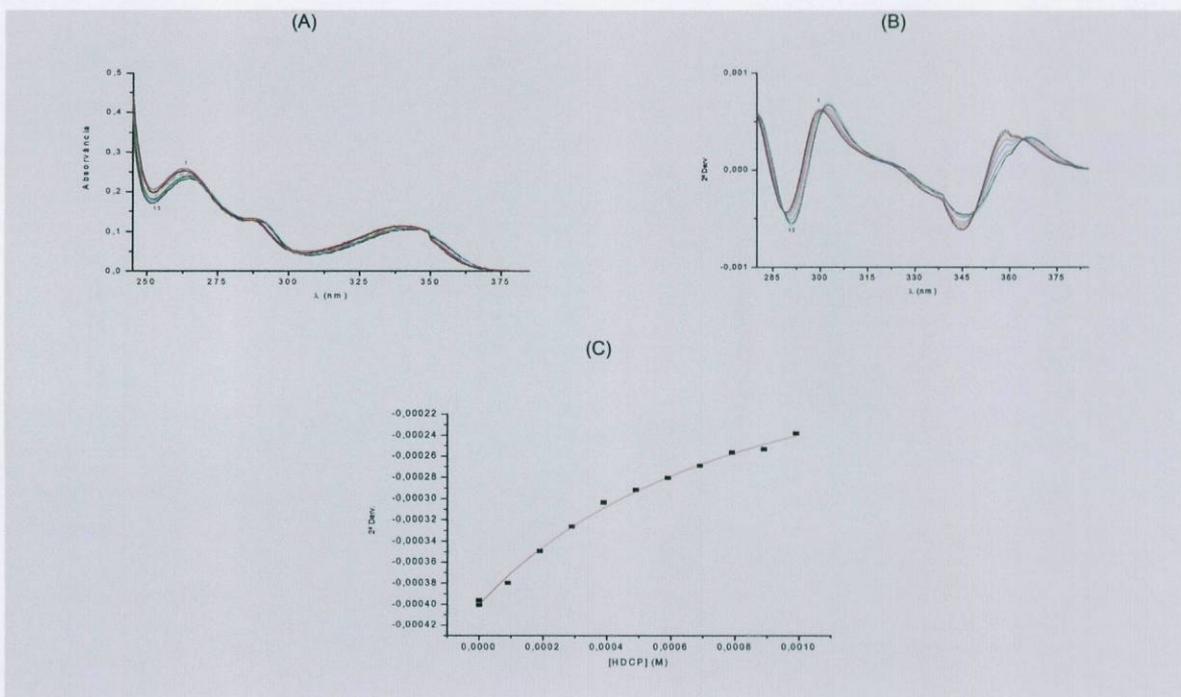


Figura 5.10 Espectros da absorvência (A), segunda derivada do espectro de absorvência (B) e do valor da segunda derivada em função da concentração de HDPC (C); (M): (1,2,3) 0; (4) 9.0×10^{-5} ; (5) 1.9×10^{-4} ; (6) 2.9×10^{-4} ; (7) 3.9×10^{-4} ; (8) 4.9×10^{-4} ; (9) 5.9×10^{-4} ; (10) 6.9×10^{-4} ; (11) 7.9×10^{-4} ; (12) 8.9×10^{-4} ; (13) 9.9×10^{-4} para a xanten-9-ona.

Segundo Omran *et al* (2002), para diferentes comprimentos de onda (λ), os valores de log P determinados são semelhantes para todos os comprimentos de onda estudados (tabela 5.2).

Tabela 5.2. Efeito dos comprimentos de onda relativamente ao valor de log P.

Xantona	λ (nm)	Log P
1-hidroxixantona	253	2,63 \pm 0,06
	267	2,42 \pm 0,08
2-hidroxixantona	261	3,80 \pm 0,04
	275	3,72 \pm 0,05
3-hidroxixantona	305	3,19 \pm 0,07
	316	3,23 \pm 0,11
4 -hidroxixantona	267	3,02 \pm 0,02
	279	3,06 \pm 0,09
xanten-9-ona	277	3,07 \pm 0,11
	290	2,94 \pm 0,09

Os valores de log P obtidos experimentalmente estão apresentados na tabela 5.3. Os valores obtidos mostram a média dos resultados e os respectivos desvio-padrão de seis ensaios experimentais independentes. Considerando a posição dos substituintes hidroxilo pode verificar-se que o valor de log P é maior quando este substituinte se encontra em C-2 e C-3.

Quando se comparam os valores de log P determinados por ambos os sistemas, verifica-se que o sistema octanol/água apresenta valores inferiores em relação ao sistema micela/tampão (tabela 5.3). Estes resultados poderão ser explicados pelo facto dos sistemas micelares contemplarem as interacções electrostáticas estabelecidas entre os grupos polares dos fosfolípidos e as substâncias estudadas, fenómeno que não se verifica no sistema octanol/água.

Tabela 5.3. Valores de log P obtidos pelos sistemas octanol/água e micela/tampão.

Xantona	Octanol-Água (pH 5,0)	Octanol-Água (pH 7,4)	HDPC (pH 7,4)
1-hidroxixantona	2,01 \pm 0,206	1,29 \pm 0,045	2,53 \pm 0,086
2-hidroxixantona	1,95 \pm 0,170	1,09 \pm 0,012	3,76 \pm 0,047
3-hidroxixantona	1,74 \pm 0,026	0,72 \pm 0,019	3,21 \pm 0,078
4-hidroxixantona	1,75 \pm 0,015	0,63 \pm 0,019	3,04 \pm 0,078
xanten-9-ona	1,93 \pm 0,019	1,08 \pm 0,016	3,00 \pm 0,099

No sistema octanol/água (pH 7,4), o maior valor de log P é apresentado pela 1-hidroxixantona, devido ao estabelecimento da ponte de hidrogénio entre o hidroxilo e o átomo de oxigénio do carbonilo. No sistema HDPC (pH 7,4), a mesma xantona apresenta o menor valor de log P, devido ao impedimento de se estabelecerem interacções em consequência da ponte de hidrogénio estabelecida.

Os valores de log P apresentados pela xanten-9-ona, em ambos os sistemas (pH 7,4) são justificados pela lipofilia da substância.

Nas secções seguintes apresentam-se os resultados e a discussão relativos aos estudos da avaliação da fluidez membranar e da avaliação da interacções electrostáticas.

5.3 Interação com os sistemas biomembranares

5.3.1 Fluidez Membranar

A desactivação da fluorescência de sondas fluorescentes permite obter informação sobre a localização de substâncias em estudo na bicamada lipídica (Lúcio et al., 2004). Por este motivo, a sua utilização em estudos da avaliação das interacções membranares é frequente. As sondas fluorescentes têm por base a utilização de séries de substâncias estruturalmente semelhantes contendo o mesmo grupo fluorescente covalentemente ligado em diferentes posições de uma cadeia hidrocarbonada localizada paralelamente aos agentes anfífilicos constituintes da bicamada ou micela.

As sondas de fluorescência devem apresentar as seguintes características (Matos, 2001; Lopes, 1997):

- a) um coeficiente de partilha membrana/solução aquosa o maior possível, para que a sonda se encontre praticamente toda incorporada na bicamada, (ou que o rendimento de fluorescência (Φ_f) na fase aquosa seja nulo);
- b) um valor de Φ_f na membrana elevado, para que a relação sinal/ruído seja aceitável;
- c) um valor do tempo de vida do estado excitado significativo, para que não seja necessário uma concentração elevada de sonda.

Estas características permitirão que o fluoróforo se encontre em concentrações inferiores às concentrações do detergente ou desactivador (Lopes, 1997).

As sondas da série do ácido n-antioilxiesteárico (n-AS), representadas na figura 5.11 apresentam um grupo antracénico ligado em diferentes posições de uma cadeia alquilo, assinaladas pela numeração n, através de uma ligação éster (New, 1990).

As principais propriedades que este tipo de sondas apresenta encontram-se seguidamente mencionadas (Blatt e Sawyer, 1985 cit. Matos, 2001):

- os constituintes desta série apresentam espectros e desactivação de fluorescência semelhantes em solventes de viscosidade e polaridade variadas;
- as suas posições relativas num grande número de estruturas (micelas, bicamadas lipídicas e membranas naturais) são conhecidas;
- a solubilização em estruturas organizadas é melhor do que em meio aquoso;
- o valor do tempo de vida do estado excitado em diversas estruturas é conhecido.

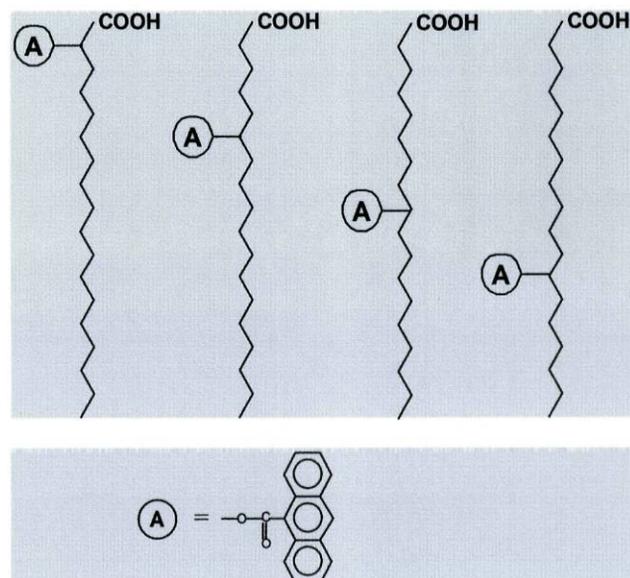


Figura 5.11. Estrutura química das sondas n-AS (n=2,6,9 e 12); a denotação A corresponde ao grupo antracénico (Fonte: Matos, 2001).

A série de sondas n-AS tem sido amplamente utilizada em estudos de localização de moléculas e de determinação da extensão de incorporação em lipossomas, micelas, membranas naturais e células inteiras (Matos, 2001).

O grupo antracénico dispõe-se em níveis sucessivos de profundidade de acordo com o átomo de carbono a que está ligado. Para a sonda 2-AS o grupo antracénico localiza-se próximo da região polar da bicamada enquanto que para a sonda 12-AS se situa mais profundamente. As sondas 6-AS e 9-As localizam-se em posições intermédias (Ferreira *et al.*, 2003; Matos, 2001).

Nestes estudos da avaliação das interações com os sistemas biomembranares apenas foi utilizada a sonda fluorescente 6-AS.

A anisotropia de fluorescência é uma técnica analítica que visa quantificar o gradiente de fluidez existente nas estruturas membranares. Baseia-se na excitação fotoselectiva do fluoróforo por luz polarizada. Os fluoróforos absorvem preferencialmente fótons cujos vectores eléctricos de excitação, se encontrem alinhados paralelamente ao seu momento de transição (Lakowicz, 1999).

A anisotropia pode ser classificada em anisotropia de estado estacionário (*steady-state*), a qual efectua uma medição pontual e em anisotropia resolvida no tempo (*resolved time*), que executa uma medição contínua. Na anisotropia “steady-state”, as amostras são excitadas com luz polarizada vertical e a intensidade de fluorescência é registada com o polarizador orientado paralela (I_{\parallel}) e perpendicularmente (I_{\perp}) ao polarizador de excitação (Lúcio *et al.*, 2004; Lakowicz, 1999). A expressão matemática que descreve este tipo de anisotropia é :

$$r_{ss} = \frac{I_{\parallel} - G I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2G I_{\perp}} \quad (5.9)$$

onde I_{\parallel} , G e I_{\perp} representam respectivamente, a intensidade de fluorescência registada com o polarizador orientado paralelamente, factor de correcção instrumental e a intensidade de fluorescência registada com o polarizador orientado perpendicularmente (Lúcio *et al.*, 2004).

Para uma molécula fluorescente dissolvida num solvente isotrópico, a anisotropia de fluorescência (r) diminui exponencialmente até ao valor zero, sendo o processo de despolarização traduzido pela equação de Perrin :

$$r = \frac{r_0}{1 + (\tau/\theta)} \quad (5.10)$$

onde, r_0 , τ e θ , representam respectivamente, a anisotropia na ausência de difusão rotacional, o tempo de vida de fluorescência e o tempo de correlação rotacional para o processo de difusão.

Quando o ambiente anisotrópico da membrana impede o movimento de rotação do fluoróforo, a anisotropia decresce para um valor finito de r_∞ , sendo o processo de despolarização descrito pela equação de Perrin modificada :

$$r = \frac{(r_0 - r_\infty) * \theta}{\theta + \tau} + r_\infty \quad (5.11)$$

onde, r_∞ representa a anisotropia para um tempo infinito, reflectindo a limitação do movimento de rotação da sonda fluorescente pelo fluoróforo (Lúcio *et al.*, 2004; Lakowicz, 1999) .

O tempo de correlação (θ) depende inicialmente da resistência local ao movimento de rotação. Esta resistência tem sido relacionada com a microviscosidade apresentada pela membrana. A expressão matemática que descreve esta relação é conhecida pela equação de Stokes- Einstein:

$$\theta = \frac{\bar{\eta} * V}{RT} \quad (5.12)$$

onde, $\bar{\eta}$, V , R e T , representam respectivamente, a microviscosidade da membrana, a temperatura (em Kelvin, K), a constante dos gases perfeitos e o volume da unidade de rotação.

As alterações na anisotropia (r) podem reflectir mudanças no tempo de correlação (θ) o qual, por sua vez, está directamente relacionado com a microviscosidade (η), para uma determinada temperatura. Assim, o grau de fluidez da membrana, como recíproco

da viscosidade, pode ser expresso em termos do movimento anisotrópico das cadeias alquila dos fosfolípidos (Lúcio *et al.*, 2004).

Sob certas condições, o movimento das sondas fluorescentes da série n- AS encontra-se totalmente desimpedido pelo fluoróforo, ou seja, a anisotropia para um tempo infinito (r_∞) adquire o valor zero para a fase cristal-líquido.

Modificações no valor do tempo de vida do fluoróforo, no estado excitado (τ), deverão também ser consideradas (Lúcio *et al.*, 2004). Quando a desactivação entre o fluoróforo e o desactivador é do tipo colisional a relação da intensidade de fluorescência pode ser relacionada com o tempo de vida:

$$\frac{I_0}{I} = \frac{\tau_0}{\tau'} \quad (5.13)$$

onde, I_0/I e τ_0/τ' , representam respectivamente, a intensidade do fluoróforo/ tempo de vida dos fluoróforos na presença e na ausência do desactivador. A diminuição de τ' é devida ao facto de a desactivação ser um processo adicional que reduz a população dos fluoróforos no estado excitado. Como τ_0 é um parâmetro característico para cada sonda e como a razão I_0/I pode ser determinada por estudos de desactivação da fluorescência, é possível calcular o valor de τ' (Lúcio *et al.*, 2004; Lakowicz, 1999).

Para condições experimentais bem definidas e com $r_\infty=0$, a anisotropia corrigida adopta a seguinte expressão:

$$r' = \frac{r_0}{1 + (\tau'/\theta)} \quad (5.14)$$

onde r_0 , τ' e θ , representam respectivamente, a anisotropia na ausência de difusão rotacional, o tempo de vida do fluoróforo no estado excitado e o tempo de correlação.

Dividindo a equações 5.10. e 5.14 obtém-se a expressão:

$$r' = \frac{\theta + \tau_0}{\theta + \tau'} * r_{ss} \quad (5.15)$$

onde, r_{ss} representa a anisotropia de estado estacionário.

A determinação dos valores de anisotropia resultam da aplicação da equação 5.6. Os valores de r' representam a anisotropia corrigida e r_{ss} os valores experimentais obtidos (Lúcio *et al.*, 2004).

As figuras 5.12., 5.13 e 5.14, exemplificam os resultados obtidos para a anisotropia em função de concentrações crescentes de desactivador. A observação dessas figuras, mostram que não existem alterações significativas na fluidez da membrana, com o aumento da concentração de xantona, sugerindo que estas substâncias se localizam à superfície da membrana dos lipossomas.

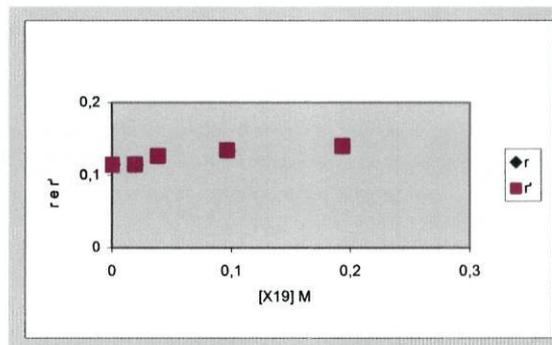


Figura 5.12. Efeito do desactivador 2-hidroxi-xantona nos valores de anisotropia corrigida (r') e nos valores de anisotropia de estado estacionário (r_{ss}), em lipossomas unilamelares (LUV) com concentração de 500 μM .

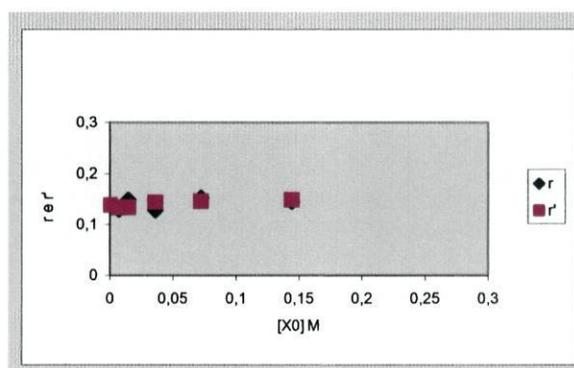


Figura 5.13. Efeito do desactivador xanten-9-ona nos valores de anisotropia corrigida (r') e nos valores de anisotropia de estado estacionário (r_{ss}), em lipossomas unilamelares (LUV) com concentração de 500 μM .

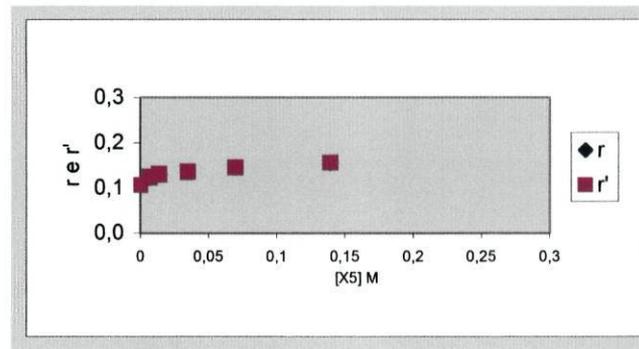


Figura 5.14. Efeito do desactivador xanten-9-ona nos valores de anisotropia corrigida (r') e nos valores de anisotropia de estado estacionário (r_{ss}), em lipossomas unilamelares (LUV) com concentração de 500 μM .

Variações no grau de fluidez da membrana induzidas pela introdução de sondas fluorescentes incorporadas em moléculas desactivadoras da fluorescência, permitem assumir a existência de perturbações estruturais em modelos miméticos da biomembrana (Lúcio *et al.*, 2004). Contudo, os resultados obtidos nestes estudos, mostraram não existirem perturbações significativas no grau de fluidez.

5.3.2 Interações electrostáticas

Os mecanismos electrostáticos desempenham um papel fundamental em variados processos biológicos. As biomembranas apresentam grupos ionizados ou polares, que constituem grupos integrantes dos fosfolípidos, glicolípidos ou glicoproteínas. Moléculas que apresentem carga, ligadas ou adsorvidas à superfície da membrana, contribuem para a existência de um potencial de superfície. Este potencial desempenha um papel biológico significativo, pela sua participação em vários processos celulares, tais como de regulação, interacção membranar ou de ligação de solutos (Cevc, 1990 *cit* Matos, 2001).

Um gradiente de potencial electrostático transmembranar (fig.5.15), confere às biomembranas um estado de polarização, essencial a variados mecanismos biológicos, como por exemplo, o transporte através da biomembrana e a transmissão do impulso nervoso (Matos, 2001).

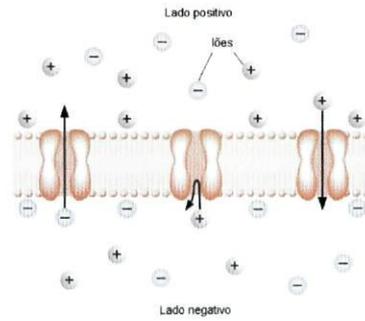


Figura 5.15. Representação do gradiente de potencial electrostático transmembranar (Fonte: <http://soma.npa.uiuc.edu>).

Muitos destes estudos de avaliação dos efeitos das interações electrostáticas são efectuados em sistema miméticos das membranas celulares, como por exemplo, em lipossomas (Ferreira *et al*, 2003; Matos, 2001).

A perda de íões da superfície e/ou a adsorção de íões de uma solução podem promover a existência de uma carga superficial, quando partículas coloidais se encontram dispersas num solvente polar como a água, originando-se uma interface que se caracteriza por uma densidade superficial de carga (σ). A disposição da interface carregada numa solução contendo íões promove uma distribuição assimétrica de contra-íões e co-íões, originando uma dupla camada eléctrica neutra (Matos, 2001). A representação esquemática da dupla camada pode ser observada na figura 5.16.

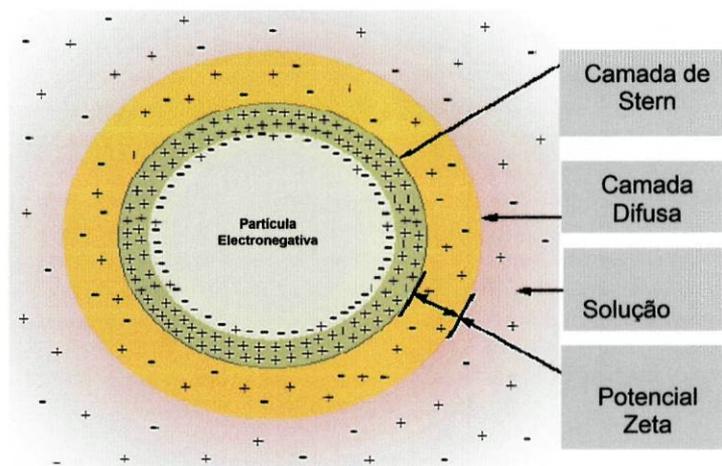


Figura 5.16. Representação esquemática da dupla camada eléctrica à superfície de uma partícula coloidal (Fonte: biomedx.com).

A dupla camada eléctrica apresenta-se constituída por dois domínios (Wallwork e Grant, 1983 *cit.* Matos, 2001): a camada de Stern e a camada de Gouy-Chapman, ou camada difusa. A camada de Stern constitui a parte fixa da dupla camada, que se estende da superfície da partícula ao plano de Stern e é formada por contra-íões firmemente adsorvidos à interface e às respectivas moléculas de hidratação (figura 5.16). A camada de Gouy-Chapman, ou camada difusa (figura 5.16) é formada por contra-íões fracamente adsorvidos à superfície, por co-íões e as respectivas moléculas de hidratação. O plano de Stern localiza-se entre a camada de Stern e a camada de Gouy-Chapman. (Wallwork e Grant, 1983 *cit.* Matos, 2001).

Quando uma partícula coloidal se move em resultado da aplicação de um campo eléctrico, a camada fixa e algumas moléculas de solvente da camada difusa movem-se com ela formando uma unidade. O limite externo desta unidade é designado por superfície de corte ou plano de corte ou ainda de *shear plane* (Wallwork e Grant, 1983 *cit.* Matos, 2001). A figura 5.17 permite observar essa superfície de corte, bem como a existência de uma variação exponencial da carga com a distância à superfície.

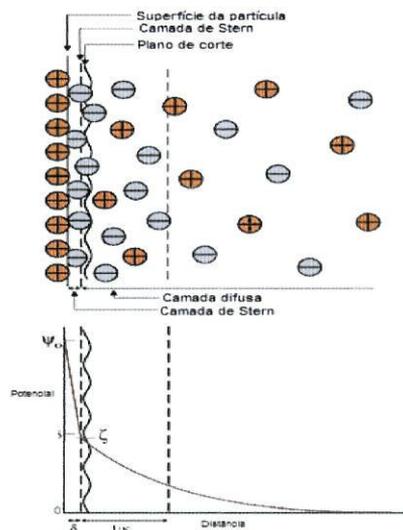


Figura 5.17. Representação esquemática do potencial da membrana com a distância à superfície, segundo a teoria de Gouy-Chapman. O símbolo ψ_0 representa o potencial eléctrico à superfície da membrana e o símbolo ζ representa o potencial-zeta (Fonte: <http://www.silvercolloids.com>).

O potencial da superfície de corte é denominado potencial-zeta (ζ) ou electrocinético por determinar a velocidade do movimento da partícula no campo eléctrico (Wallwork e Grant, 1983 *cit* Matos, 2001). O potencial-zeta é calculado a partir da medida da mobilidade electroforética, μ , pela expressão de Helmholtz-Smoluchowski:

$$\zeta = \mu \epsilon_r \epsilon_0 / \eta \quad (5.16)$$

onde, ϵ_r representa a constante dieléctrica da água (78,54 a 25 °C), ϵ_0 a permitividade do espaço livre ($8,85419 \times 10^{-12} \text{ J}^{-1}\text{C}^2\text{m}^{-1}$) e η a viscosidade da fase aquosa.

A determinação do potencial zeta, diâmetro dos lipossomas e do índice de polidispersão foi efectuada num equipamento cuja representação esquemática pode ser observada na figura 5.18. As medições foram realizadas num ângulo (θ) fixo de 90° e à temperatura de 25 °C, numa célula ZET 5104, constituída por um capilar cilíndrico de 0,4 mm de diâmetro submerso num banho de água de temperatura controlada por uma sonda com uma precisão de 0,1 ° C (Matos, 2001).

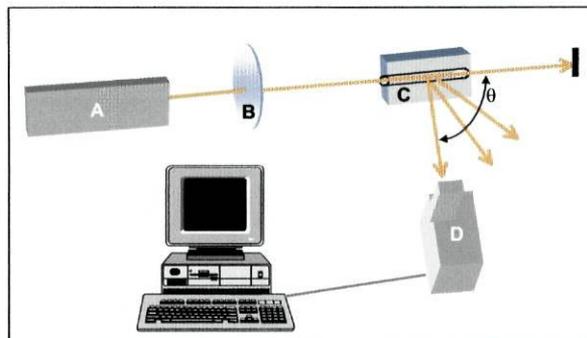


Figura 5.18. Representação esquemática do equipamento utilizado para determinação do diâmetro e do potencial-zeta dos lipossomas (Malvern Zeta Sizer 5000): A- Fonte de raios laser; B- Lente; C- Célula contendo a amostra; D- Fotomultiplicador (Fonte: Matos, 2001).

O princípio deste método consiste em medir a velocidade da variação da intensidade da luz pelas partículas em suspensão. Devido ao facto de as partículas mais pequenas apresentarem maiores coeficientes de difusão (D), a intensidade da luz difractada ao longo do tempo varia tão mais rapidamente quanto menores forem as partículas. A análise é feita através de um processo matemático denominado auto-correlação (New,

1990). A partir da análise da função de auto-correlação obtém-se o valor do coeficiente de difusão (D).

A equação de Stokes-Einstein permite determinar o diâmetro das vesículas e a sua expressão matemática é a seguinte:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R} \quad (5.17)$$

Nesta equação, k representa a constante de Boltzman (1.38×10^{-16} erg/°K), T a temperatura absoluta, η a viscosidade do meio e R o raio da partícula.

Os valores do potencial-zeta (ζ) dos lipossomas de EPC foram determinados, quer na ausência quer na presença de concentrações crescentes das xantonas estudadas e todas as medições foram efectuadas à temperatura de 25° C, tendo sido cada valor obtido a média de dez valores experimentais. Os valores obtidos resultaram da média e desvio-padrão de seis ensaios experimentais independentes. Quando se comparam os valores do potencial-zeta (tabela 5.4) na presença e na ausência de xantona, verifica-se que não existem alterações significativas com o aumento da concentração destas substâncias.

Tabela 5.4. Valores médios de potencial zeta (ζ) das xantonas estudadas, em solução tampão Hepes (pH 7,4) na presença de lipossomas unilamelares (LUV) de EPC.

Xantona	ζ (mV) na presença de xantona	ζ (mV) na ausência de xantona
1-hidroxixantona	-2,2 ± 1,2	-2,3 ± 1,4
2-hidroxixantona	-2,0 ± 0,6	-2,4 ± 1,0
3-hidroxixantona	-1,7 ± 0,2	-2,1 ± 0,9
4-hidroxixantona	-1,2 ± 0,2	-2,6 ± 1,3
xanten-9-ona	-1,4 ± 0,4	3,5 ± 0,8

A figura 5.19 exemplifica os resultados obtidos para os estudos da avaliação das interações electrostáticas destas moléculas com a membrana dos lipossomas de fosfatidilcolina de gema de ovo (EPC), mostrando não haver alterações significativas de cargas para o valor de pH 7,4.

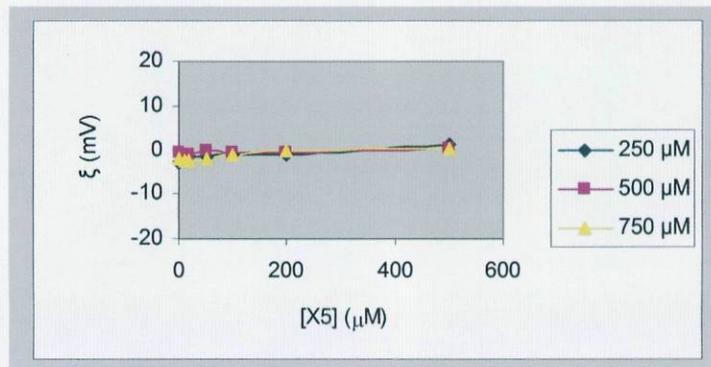


Figura 5.19. Representação gráfica da variação dos valores de potencial-zeta (ζ) com a concentração de 4-hidroxixantona, em solução tampão Hepes (pH 7,4), na presença de lipossomas unilamelares (LUV) de EPC.

Os resultados obtidos para a dimensão e para o índice de polidispersão dos lipossomas (tabela 5.5) mostram que o diâmetro destas estruturas não apresenta alterações significativas na presença de xantona.

Tabela 5.5. Diâmetro e polidispersão médios dos lipossomas (solução tampão Hepes, pH 7,4; força iónica 0,1 M).

Xantona	Dimensão (nm) na presença de xantona	Dimensão (nm) na ausência de xantona	Índice de polidispersão
1-hidroxixantona	179,9 ± 58,9	162,4 ± 58,9	0,46 ± 0,3
2-hidroxixantona	151,9 ± 30,3	140,0 ± 10,5	0,31 ± 0,1
3-hidroxixantona	172,5 ± 33,3	160,6 ± 11,1	0,44 ± 0,2
4-hidroxixantona	172,0 ± 34,8	146,8 ± 23,9	0,30 ± 0,1
xanten-9-ona	136,8 ± 17,2	138,8 ± 20,2	0,28 ± 0,2

Segundo Martí *et al.*, *cit.* Matos (2001), o índice de polidispersão traduz o grau de heterogeneidade da amostra. Quanto maior for o intervalo de diâmetros entre os quais

se situa o diâmetro médio, ou seja, quanto maior o desvio padrão, maior será o índice de polidispersão.

6 CONCLUSÕES

Os valores de log P determinados pelo sistema HDPC/tampão (pH 7,4) mostraram ser superiores aos valores de log P obtidos pelo sistema octanol/água (pH 7,4 e pH 5,0). Valores teóricos de log P calculados pelos programas "CLOGP", "KWWIN" e "IAlogP" corroboram com os resultados experimentais obtidos.

Este comportamento das xantonas, poderá ser justificado pelo facto de o sistema micelar ter em consideração as interacções electrostáticas estabelecidas entre os grupos polares dos fosfolípidos e as substâncias estudadas.

Os valores de log P obtidos utilizando o sistema octanol/água de pH 7,4 são menores do que os valores de log P obtidos utilizando o mesmo sistema de pH 5,0 (tabela 5.3). Considerando os valores de pKa, compreendidos entre 9,15 e 9,23, determinados por Wu *et al.* (2004) e admitindo semelhanças estruturais e das características ácido-base entre as xantonas estudadas e as de origem natural, os resultados obtidos sugerem que as moléculas se encontram na forma protonada (neutra) para pH 5,0.

No sistema HDPC/ tampão, os valores de log P mais elevados são apresentados pela 2-hidroxixantona e pela 3-hidroxixantona (tabela 5.3). Uma justificação para estes resultados reside no facto de estas estruturas apresentarem maior estabilidade.

De um modo geral, a formação de dipolos estabilizados por ressonância podem justificar os diferentes comportamentos observados.

Estudos preliminares do coeficiente de partilha de algumas xantonas di-hidroxiladas, em micelas de hexadecilfosfocolina (HDPC) de pH 7,4, indicam que o valor deste parâmetro é superior quando comparado com os valores obtidos para xantonas mono-hidroxiladas.

Nos estudos de avaliação da anisotropia, os resultados obtidos mostraram não existirem perturbações significativas no grau de fluidez da membrana dos lipossomas de fosfatidilcolina de gema de ovo (EPC) com o aumento de concentração das substâncias estudadas. Este comportamento, poderá ser justificado por as substâncias estudadas se localizarem à superfície da membrana dos lipossomas e consequentemente as interacções estabelecidas não afectarem a sua estrutura.

Nos estudos de avaliação das interações electrostáticas destas substâncias com a membrana das estruturas anteriormente referidas, os resultados obtidos mostraram que, para concentrações crescentes de xantona e, para as diferentes xantonas estudadas, não existe uma carga formal entre estas substâncias e a superfície membranar.

Os resultados obtidos na determinação do diâmetro médio dos lipossomas de EPC mostraram que estes constituem uma população homogénea não havendo alterações significativas do seu tamanho na presença de xantona.

Como principal conclusão, o desenvolvimento de estudos mais aprofundados, designadamente, a utilização de outras metodologias para a determinação do valor do log P e/ou a utilização de outras sondas fluorescentes em estudos de interacção membranar, a determinação de outros parâmetros físico-químicos, como por exemplo, o pKa e estudos de relação estrutura-actividade, poderão contribuir para um melhor conhecimento e compreensão do comportamento dos xantonas quer em termos farmacológicos/biológicos quer em termos ambientais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; Jonhson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. e Walter, P., *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed., Garland Science, USA, **2002**, pp 583-615.

Barbosa, C.M.G., Desenvolvimento e caracterização de formulações lipossômicas de monofosfato de vidarabina para o tratamento da hepatite B crônica. *Dissertação de Doutorado, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto*, **1995**, pp19-32.

Bester, K. e Theobald, N., Results of non target screening of lipophilic organic pollutants in the German Bight V: Xanten-9-one, *Wat. Res.*, 1999, 8, 2277-2282.

Bo, T. e Huwei, L., Separation methods for pharmacologically active xanthenes, *Journal of Chromatography*, 2004, 1061 (2), 217-223.

Boucher, D.L.; Brown, M.A.; McGarvey, B.R. e Tuck, D.G., Spectroscopic and crystallographic studies of adducts of aluminium trichloride with cyclic ketones, para-quinones and ortho-quinones, *J.Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1999, 3445-3450.

Brahm, D. e Jain, B.D. *Jour. Indian Chem. Soc.*, Spectrophotometric Determination of Iron (III) with 1-Hydroxyxanthone, 1962, 39 (4), 247-250

Castelli, F.; Raudino, A. e Fresta, M., A mechanistic study of the permeation kinetics through biomembrane models: Gemcitabine-phospholipid bilayer interaction, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2004, 285 (1), 110-117.

Castro, B.; Gameiro, P.; Lima, J.L.F.C.; Matos, C. e Reis, S., A Fast and Reliable Spectroscopic Method for the Determination of Membrane-Water Partition Coefficients of Organic Compounds, 2001b, *Lipids*, 36 (1), 89-96.

Castro, B.; Gameiro, P.; Lima, J.L.F.C.; Matos, C. e Reis, S., Interaction of drugs with hexadecylphosphocholine micelles. Derivative spectroscopy, acid-base and solubility studies, *Materials Science & Engineering C*, 2001a, 18, 71-78.

Daughton, C.G.; Jones-Lepp, T.L. (eds.), *Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Scientific and Regulatory Issues*, Symposium Series 791, Am. Chem.Soc.:Washington, D.C., 2001.

Davis, J.W. e Carpenter, C.L. *Reviews of Environmental Contamination & Toxicology*, 1997, 149, 87-137.

Fernandes, E.G.R., *Síntese e Elucidação Estrutural de Xantonas, Xantonolignóides e Determinação da Actividade Biológica*. Dissertação de doutoramento, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, 1996, pp 13-14.

Ferreira, H.; Lúcio, M.; Castro, B.; Gameiro, P.; Lima, J.L.F.C. e Reis, S., Partition and location of nimesulide in EPC liposomes: a spectrophotometric and fluorescence study, *Anal Bioanal Chem*, 2003, 377, 293-298.

Gnerre, C.; Thull, U.; Gaillard, P.; Carrupt, P.; Testa, B.; Fernandes, E.; Silva, F.; Pinto, M.; Pinto, M.M.M.; Wolfender, J.L.; Hostettman, K. e Cruciani, G., Natural and Synthetic Xanthenes as Monoamine Oxidase Inhibitors: Biological assay and 3D-QSAR, *Helvetica Chimica Acta*, 2001, 84, 552-570.

Grover, P.; Shah, D.; Shah, R., Xanthenes. Part IV. A New Synthesis of Hydroxyxanthenes and Hydroxybenzophenones. *J. Chem. Soc.* 1955, 3982-3985.

Hansch, C. e Leo, A., *Exploring QSAR: Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology*, Am. Chem. Soc., Washington, 1995, pp 97-121.

Heinrich, K., *Industrial Pharmaceutical Biotechnology*, Willey, Germany, 2002, pp 241-243.

Helms, J.B. e Zurzolo, C., Lipids as Targeting Signals: Lipid Rafts and Intracellular Trafficking, *Traffic*, 2004, 5, 247-254.

Hotani, H.; Nomura, F. e Suzuki, Y., Giant liposomes: from membrane dynamics to cell morphogenesis, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 1999, 4, 358-368.

http://www.mpa.se/om_verket/publikationer/miljoupdraget/040824_miljoupdraget-sammanfattning_en.pdf (acedido em Agosto, 2004)

<http://www.daylight.com/daycgi/clogp> (acedido em Setembro, 2005)

http://www.syrres.com/esc/est_kowdemo.htm (acedido em Setembro, 2005)

<http://www.ingentaconnect.com/content/ben/mrmc/2003/00000003/00000008/art00005> (acedido em Setembro, 2005)

Kelly, J.X.; Winter, R.; Riscoe, M. e Peyton, D.H., A spectroscopic investigation of the binding interactions between 4,5-dihydroxyxanthone and heme, *J. Inorg. Biochem.*, 2001, 86, 617-625.

Kitamura, K.; Imayoshi, N.; Goto, T.; Shiro, H.; Mano, T. e Nakai, Y., Second derivative spectrophotometric determination of partition coefficients of chlorpromazine and promazine between lecithin bilayer vesicles and water, *Anal. Chim. Acta* 1995, 304, 101-106.

Lakowicz, J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Second Edition. Keuwer Academic / Plenum Publishers, New York, 1999, pp.12-21, 240-245, 291-304.

Lasic, D., *Liposomes-from Physics to Applications*. Elsevier. Amsterdam, 1993, pp. 10-24, 54-62, 63-73.

Lipowski, R., Domains and Rafts in Membranes-Hidden Dimensions of Selforganization, *J. Biological Physics*, 2002, 28, 195-210.

Lopes, A., Partilha de Xenobióticos Orgânicos em Agregados Anfífilos. Uma Proposta de Novos Previsores de Bioconcentração, *Dissertação de Doutoramento, Instituto de Tecnologia Química e Biológica. Universidade Nova de Lisboa*, 1997, pp 32-55.

Lúcio, M.; Ferreira, H.; Lima, J.L.F.C.; Matos, C.; Castro, B. e Reis, S., Influence of some anti-inflammatory drugs in membrane fluidity studied by fluorescence anisotropy measurements, 2004, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 6, 1493-1498.

Macri, B.; Stoian, G.; Marin, A. e Flonta, M., Hydrophobicity of Tricyclic and polycyclic Antidepressants Influences their Interaction with Lipid Bilayers, *Mathematical Modeling of Environmental and Life Sciences Problems (Proceedings of Second Workshop, Bucharest, Romania)*, July, 2003, 65-80

Matos, C. M. S., *Interação de Fármacos com Lipossomas. Efeito nas propriedades físico-químicas*, *Dissertação de Doutoramento, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto*, 2001, (capítulo 1, 1-33; capítulo 3, 1-13; capítulo 10, 10-19).

Mazzobre, M.; Román, M.; Mourelle, A. e Corti, H., Carbohydrate, Octanol-water partition coefficient of glucose, sucrose, and trehalose, *Research*, 2005, 1207-1211.

Moroz, A. e Shvartsberg, M., The Ullmann Ether Condensation, *Russian Chemical Reviews*, 1974, 43(8), 1443-1461.

New, R.R.C., *Liposomes. A practical approach*, Rickwood D.; Hames, B. (eds.), IRL Press, Oxford, 1990, 27, 105-108, 191.

Njus, D. *Fundamental Principles of Membrane Biophysics*. Department of biological Sciences. Wayne State University. USA, 2000.

Núñez, M.; Maguna, F.; Okulik, N. e Castro, A., QSAR modeling of the MAO inhibitory activity of xanthon derivatives, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2004, 14, 5611-5617.

OCDE Guide Lines for the testing of chemicals (Adopted by Council on the 27th July 1995)- Partition Coefficient (n-octanol/water).

Ojeda, C.B.; Rojas, F.S., Recent developments in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry, *Anal.Chim. Acta*, 2004, 518, 1-24.

Omran, A.A.; Kitamura, K.; Takegami, S.; Kitade, T.; Sayed, A.Y.; Mohamed, A.M. Effect of Phosphatidylserine Content on the Partition Coefficients of Diazepam and Flurazepam between Phosphatidylcholine-Phosphatidylserine Bilayer of Small Unilamellar Vesicles and Water Studied by Second Derivative Spectrophotometry, *Chem. Pharm. Bull.*, 2002, 50, 312-315.

Peres, V. e Nagem, T.J. e Oliveira, F.F.; Trioxygenated Naturally Occurring Xanthones *Phytoch.*, 2000, 55, 638-710.

Pinto, M. e Nascimento, M.S.J., Anticomplementary activity of hydroxy- and methoxyxanthones, *Pharm. Pharmacol Lett.*, 1997, 7 (2/3), 125-127.

Pola, A.; Michalak, K.; Burliga, A.; Motohashi, N. ; Kawase, M., Determination of lipid bilayer/water partition coefficient of new phenothazines using the second derivative of absorption spectra method, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2004, 21, 421-427.

Portela, C.; Afonso, C.M.M.; Pinto, M.M.M. e Ramos, M.J. Receptor-drug association studies in the inhibition of the hematin aggregation process of malaria, *FEBS Lett.*, 2003, 27435, 217-222.

Rakotomanga, M.; Loiseau, P.M. e Saint-Pierre-Chazalet, M., Hexadecylphosphocholine interaction with lipid monolayers, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, 1661, 212-218.

Ranjith, H. e Wijesinghe, W.M.N.M., A Trioxxygenated Diprenylated Chromenexanthone from *Calophyllum Moonii*, *Phytochem.* 1997, 46, 1293-1295.

Rodrigues, C.; Gameiro, P.; Reis, S.; Lima, J.L.F.C.; Castro, B., Spectrophotometric determination of drug partition coefficients in dimyristoyl-L- α -phosphatidylcholine/water: a comparative study using phase separation and liposome suspensions, *Anal. Chim. Acta*, 2001, 428, 103-109.

Rojas, F.S.; Ojeda, C.B.; Pavon, J.M.C., Derivate Ultraviolet-Visible Region Absorption Spectrophotometry and Its Analytical Applications, *Talanta*, 1988, 35 (10), 753-761.

Saghaie, L.; Hider, R.; Mostafa, S. A. Daru, Comparison of Automated Continuous Flow Method with Shake-Flask Method in Determining Partition Coefficients of Bidentate Hydroypyridone Ligands, 2003, 2, 111.

Sangster, J. Octanol-Water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry. John Willey & Sons, 1997, pp 57-75.

Santos, N.; Prieto, M.; Castenho, A., Quantifying molecular partition into model systems of biomembranes: na emphasis on optical spectroscopic methods, *Biochemica et Biophysica Acta*, 2003, 1612, 123-135.

Saraiva, L.; Fresco, P.; Pinto, E.; Sousa, E.; Pinto, M. e Gonçalves, J. Synthesis and In Vivo Modulatory Activity of Protein Kinase C of Xanthone Derivates, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2002, 10, 3219-3227.

Saxena, G.M. e Seshadri, F., Stability of Metal-Chelate Compound of Benzopyrone Derivates, *Proc. Indian Acad. Sc.*, 1957, 46 A, 13, 218-223.

Quillinan, A. e Scheinmann, F. Studies in the Xanthone Series. Part XII. A General Synthesis of Olyoxygenated Xanthones from Benzophenone Percursors, *J. Chem. Soc.*, **1973**, 1329-1337.

Sousa, E.; Silva, A.; Pinto, M.; Pedro, M.; Cerqueira, F. e Nascimento, M., Isomeric Kielcorins and Dihydroxyxanthones: Synthesis, Structure Elucidation, and Inhibitory

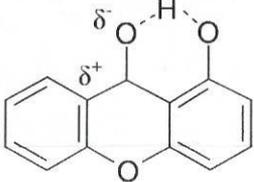
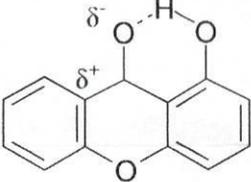
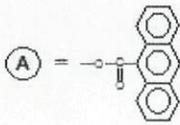
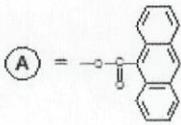
Activities of Growth of Human cancer Cell Lines and on the Proliferation of Human Lymphocytes In Vitro, *Helvetica Chimica Acta*, 2002, 85, 2862-2876.

Sousa, E.S.P. Derivados de Xanten-9-ona: Síntese, Determinação Estrutural e Avaliação de Actividades Biológicas. Dissertação de Doutoramento, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, 2003, pp 5-11.

Wu, X.; Gong, S.; Liao, Y e Liu, H , Determination of dissociation constants of pharmacologically active xanthenes by capillary zone electrophoresis with diode array detection, *Journal of Chromatography A*, 2004, 1061, 217-223.



Errata

Nº da página	Onde está escrito...	Deve-se ler...
Capa	Determinação de Parâmetros Físico-Químicos em Xantonas"	Determinação de Parâmetros Físico-Químicos de Xantonas
1 (1º parágrafo)	... "método de agitação em frasco"...	... "método de agitação em balão"...
6 (1º parágrafo)	...na sequestração de metais e <i>scavenger</i> de radicais livres...	...na sequestração de metais e de radicais livres...
10 (1º parágrafo)	...alquílicas...	...alquílicas...
19 (figura 3.11)	Lípidos incluindo fármacos lipossolúveis	EPC
	Solução aquosa incluindo fármacos hidrossolúveis Sonicação ou Extrusão	Solução aquosa Extrusão
32 (figura 5.1 e tabela 5.1)		
	xantona	xanten-9-ona
39 (4º parágrafo)	...isobéticos...	...isobéticos...
44 (figura 5.11)		
47 (1º parágrafo)	...alquilo...	...alquílicas...
48 (1º parágrafo e figuras 5.12 e 5.13)	...equação 5.6.	...equação 5.9.
	[X19]	[2-hidroxixantona]
	[X0]	[xanten-9-ona]
49 (figura 5.14 e legenda)	[X5]	[4-hidroxixantona]
	xanten-9-ona	4-hidroxixantona
53 (tabela 5.4)	3,5 ± 0,8	-2,5 ± 0,8
54 (figura 5.9)	[X5]	[4-hidroxixantona]