



FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

UTILIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS COMO MODELOS DE BIOMEMBRANAS NA AVALIAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA ACTIVIDADE DE ANTI-INFLAMATÓRIOS

Helena Susana da Costa Machado Ferreira

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA-FÍSICA
FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

2006



FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

UTILIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS COMO MODELOS DE BIOMEMBRANAS NA AVALIAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA ACTIVIDADE DE ANTI-INFLAMATÓRIOS

Helena Susana da Costa Machado Ferreira



FFD
FER
4149

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA-FÍSICA
FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

2006

Dissertação apresentada à Faculdade de
Farmácia da Universidade do Porto para
obtenção do grau de Doutor.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	iii
ABSTRACT	vii
RÉSUMÉ	xi
INTRODUÇÃO GERAL	xv
I. Enquadramento e objectivos gerais	xv
II. Organização da dissertação	xvi
ABREVIATURAS	xix
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO	3
1.1. Lipossomas	3
1.1.1. Considerações físico-químicas	4
1.1.1.1. Configuração e propriedades moleculares dos fosfolípidos	11
1.1.2. Classificação dos lipossomas	15
1.1.3. Selecção e preparação dos lipossomas	16
1.1.4. Estabilidade dos lipossomas	23
1.1.5. Métodos de caracterização dos lipossomas	27
1.1.6. Doseamento dos fosfolípidos	30
1.1.7. Aplicação dos lipossomas	33
1.1.7.1. Lipossomas como modelos membranares	33
1.1.7.2. Lipossomas como meio reaccional	35
1.1.7.3. Lipossomas como transportadores de fármacos	36
1.2. Anti-inflamatórios não esteróides	41
1.2.1. Inflamação	44

1.2.2. Mecanismo de acção dos AINEs	51
1.2.3. Efeitos adversos e interacções dos AINEs	53
1.2.4. AINEs inibidores não selectivos e selectivos da COX-2	57
1.2.5. AINEs em estudo	61
1.3. Interacção fármaco/lipossoma e sua importância	63
1.4. Bibliografia	67
CAPÍTULO 2. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	75
2.1. Reagentes	75
2.2. Preparação de lipossomas de EPC	75
2.3. Caracterização dos lipossomas	76
2.3.1. Determinação do diâmetro	76
2.3.2. Determinação do potencial-zeta	78
2.3.3. Verificação da estabilidade	81
2.4. Determinação da concentração de EPC	82
2.5. Preparação das soluções contendo AINEs	83
2.6. Preparação das amostras contendo lipossomas e AINEs	84
2.7. Bibliografia	85
CAPÍTULO 3. AVALIAÇÃO DA INTERACÇÃO DE ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTERÓIDES COM LIPOSSOMAS	89
3.1. Introdução	89
3.2. Metodologia experimental	101
3.2.1. Determinação das constantes de acidez por espectrofotometria UV/Vis	101
3.2.2. Determinação do coeficiente de partição	102
3.2.2.1. Espectrofotometria derivativa	102
3.2.2.2. Determinação do potencial-zeta	105
3.2.2.3. Desactivação de fluorescência	114
3.2.3. Determinação da localização por desactivação de fluorescência	116
3.2.4. Avaliação de propriedades membranares	120
3.2.4.1. Determinação do diâmetro e potencial-zeta dos lipossomas	120
3.2.4.2. Determinação da fluidez membranares por anisotropia de fluorescência	120
3.3. Parte experimental	125
3.3.1. Reagentes	125

3.3.2. Determinação espectrofotométrica das constantes de acidez	126
3.3.3. Determinação do coeficiente de partição	130
3.3.3.1. Determinação do coeficiente de partição por espectrofotometria derivativa	130
3.3.3.2. Determinação do coeficiente de partição por avaliação do potencial-zeta	132
3.3.3.3. Determinação do coeficiente de partição por desactivação de fluorescência	132
3.3.4. Determinação da localização dos AINEs	133
3.3.5. Avaliação dos efeitos dos AINEs a nível membranar	134
3.3.5.1. Determinação do diâmetro e potencial-zeta da membrana	134
3.3.5.2. Determinação da fluidez membranar	135
3.4. Resultados e discussão	136
3.4.1. Determinação espectrofotométrica das constantes de acidez	136
3.4.2. Determinação do coeficiente de partição	140
3.4.2.1. Determinação do coeficiente de partição por espectrofotometria derivativa	140
3.4.2.2. Determinação do coeficiente de partição por avaliação do potencial-zeta	157
3.4.2.3. Determinação do coeficiente de partição por desactivação de fluorescência	163
3.4.3. Determinação da localização dos AINEs	165
3.4.4. Avaliação dos efeitos dos AINEs a nível membranar	171
3.4.4.1. Determinação do diâmetro e potencial-zeta da membrana	171
3.4.4.2. Determinação da fluidez membranar	174
3.5. Conclusão	182
3.6. Bibliografia	187

CAPÍTULO 4. AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTERÓIDES	199
4.1. Introdução	199
4.2. Metodologia experimental	211
4.2.1. Avaliação da capacidade de captação dos radicais ABTS ^{•+} e DPPH [•] por espectrofotometria UV/Vis	211
4.2.2. Avaliação da capacidade de captação dos radicais HO [•] na oxidação	

da 2'-dG por HPLC	214
4.2.3. Avaliação da capacidade de captação dos radicais ROO [•] por fluorescência e anisotropia de fluorescência	215
4.2.4. Avaliação da capacidade de captação dos radicais HO [•] por fluorescência	218
4.3. Parte experimental	219
4.3.1. Reagentes	219
4.3.2. Avaliação da actividade antioxidante dos AINEs face aos radicais ABTS ^{•+} e DPPH [•]	219
4.3.3. Avaliação da actividade antioxidante dos AINEs face à oxidação da 2'-desoxiguanosina	220
4.3.4. Avaliação da actividade antioxidante dos AINEs face aos radicais ROO [•] gerados na fase aquosa e lipídica	221
4.3.4.1. Radicais ROO [•] gerados na fase aquosa	223
4.3.4.1.1. Avaliação da actividade antioxidante dos AINEs usando a sonda fluoresceína	224
4.3.4.1.2. Avaliação da actividade antioxidante dos AINEs usando a sonda HDAF	225
4.3.4.1.3. Avaliação da actividade antioxidante dos AINEs usando a sonda DPH-PA	226
4.3.4.2. Radicais ROO [•] gerados na fase lipídica	226
4.3.4.2.1. Avaliação da actividade antioxidante dos AINEs usando a sonda DPH-PA	227
4.3.4.2.2. Avaliação da actividade antioxidante dos AINEs usando a sonda fluoresceína	228
4.3.4.2.3. Avaliação da actividade antioxidante dos AINEs usando a sonda HDAF	228
4.3.5. Avaliação da actividade antioxidante dos AINEs face aos radicais HO [•]	229
4.4. Resultados e discussão	229
4.4.1. Avaliação da actividade antioxidante dos AINEs face aos radicais ABTS ^{•+} e DPPH [•]	229
4.4.2. Avaliação da actividade antioxidante dos AINEs face à oxidação da 2'-desoxiguanosina	235
4.4.3. Avaliação da actividade antioxidante dos AINEs face aos radicais	

ROO [•] gerados na fase aquosa e lipídica	237
4.4.3.1. Radicais ROO [•] gerados na fase aquosa	237
4.4.3.1.1. Avaliação da actividade antioxidante dos AINEs usando a sonda fluoresceína	238
4.4.3.1.2. Avaliação da actividade antioxidante dos AINEs usando a sonda HDAF	248
4.4.3.1.3. Avaliação da actividade antioxidante dos AINEs usando a sonda DPH-PA	254
4.4.3.2. Radicais ROO [•] gerados na fase lipídica	262
4.4.3.2.1. Avaliação da actividade antioxidante dos AINEs usando a sonda DPH-PA	263
4.4.3.2.2. Avaliação da actividade antioxidante dos AINEs usando as sondas fluoresceína e HDAF	275
4.4.4. Avaliação da actividade antioxidante dos AINEs face aos radicais HO [•]	276
4.5. Conclusão	281
4.6. Bibliografia	285
 CAPÍTULO 5. AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE E DOS EFEITOS DOS AINES NA FLUIDEZ MEMBRANAR DE ESLENÓCITOS USADOS COMO MODELOS DAS BIOMEMBRANAS	295
5.1. Introdução	295
5.2. Metodologia experimental	299
5.2.1. Avaliação da fluidez membranar por anisotropia de fluorescência	299
5.2.2. Avaliação da actividade antioxidante por fluorimetria e anisotropia de fluorescência	301
5.3. Parte experimental	302
5.3.1. Reagentes	302
5.3.2. Isolamento de esplenócitos de ratinho	302
5.3.3. Avaliação da influência dos AINEs na fluidez membranar	302
5.3.4. Avaliação da actividade antioxidante dos AINEs face à peroxidação lipídica induzida pelos radicais ROO [•]	303
5.3.5. Verificação da viabilidade celular	304
5.4. Resultados e discussão	305

5.4.1. Avaliação da influência dos AINEs na fluidez membranar	305
5.4.2. Avaliação da actividade antioxidante dos AINEs face à peroxidação lipídica induzida pelos radicais ROO [*]	311
5.5. Conclusão	316
5.6. Bibliografia	319
 CAPÍTULO 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	 327

AGRADECIMENTOS

Ao concluir este trabalho agradeço a todos aqueles que fizeram com que o mesmo se tornasse possível:

À Professora Doutora Maria de La Salette Hipólito Reis, pela orientação em todas as fases deste trabalho, pelo apoio, disponibilidade e incentivo permanentes, por todos os conhecimentos transmitidos e pelo carinho e amizade sempre demonstrados.

Ao Professor Doutor José Luís Fontes da Costa Lima, pela disponibilidade e interesse com que acompanhou este trabalho, pelos esclarecimentos científicos e pelo seu constante incentivo.

À Professora Doutora Anabela Cordeiro-da-Silva, por me ter possibilitado a realização dos trabalhos com esplenócitos, bem como pela atenção demonstrada e à Joana pelo apoio e disponibilidade constantes.

Ao Professor Doutor Agostinho Franklim, pela ajuda e disponibilidade de meios necessários para a realização de parte deste trabalho.

À Professora Doutora Iolanda Cuccovia, por me ter dado a possibilidade de frequentar a Universidade de São Paulo, por todos os conhecimentos transmitidos, por me ter proporcionado uma estadia muito agradável e a possibilidade de usufruir de novas experiências, tanto a nível profissional, como cultural e social e pela amizade, carinho e ajuda que sempre me dispensou.

Ao Professor Doutor Hernan Chaimovich, pela simpatia, boa disposição e apoio sempre demonstrados. À Larissa, ao Flávio, à Tereza, à Márcia e a todos os membros do laboratório de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo pela hospitalidade, amizade, ajuda e carinho demonstrados.

A todos os Professores Doutores e membros do Departamento de Química-Física, pela simpatia e disponibilidade demonstrada durante a realização deste trabalho.

A todos os meus colegas e amigos do Departamento de Química-Física, pela ajuda, amizade e apoio demonstrados, com especial agradecimento à Marlene e ao Christophe pelas interessantes trocas de ideias.

À Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, por me ter aceite como aluna de Doutoramento.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) pela concessão da Bolsa de Doutoramento e pelo subsídio da viagem a São Paulo e ao Programa Operacional Ciência e Inovação 2010 (POCI 2010) e ao Fundo Social Europeu (FSE) pelo co-financiamento de todos os trabalhos realizados.



Aos meus Pais, à minha tia, ao meu irmão e ao Francisco, por todo o apoio incondicional, amizade, carinho, confiança e paciência sempre demonstrados, tantos nos piores como nos melhores momentos.

RESUMO

Os trabalhos experimentais, realizados no âmbito da presente dissertação, centraram-se no estudo da interacção de seis anti-inflamatórios não esteróides, nomeadamente o diclofenac, a clonixina, o piroxicam, o tenoxicam, o etodolac e o indoprofeno, com modelos membranares. Foi estudado também a influência dessa interacção nas propriedades físico-químicas das membranas e na actividade terapêutica dos fármacos, nomeadamente a sua eficácia como antioxidantes. Os modelos membranares utilizados foram lipossomas unilamelares (LUVs) de fosfatidilcolina da gema de ovo (EPC). Alguns estudos foram também realizados na presença de esplenócitos isolados do baço de ratinhos.

O equilíbrio de partição dos fármacos entre os lipossomas e a solução aquosa foi quantificado pelo coeficiente de partição, K_p , a um valor de pH igual a 7,4, recorrendo a três metodologias diferentes, designadamente a espectrofotometria derivativa, o potencial-zeta e a desactivação de fluorescência. As três metodologias permitiram a obtenção de resultados concordantes. Para os anti-inflamatórios diclofenac e clonixina foi também determinado o coeficiente de partição lipossoma/solução aquosa a valores de pH iguais a 3,0 e 10,3 e, adicionalmente, foi efectuada a quantificação do coeficiente de partição usando lipossomas de EPC contendo na sua constituição colesterol numa percentagem de 10 e 40%, a um valor de pH igual a 7,4.

A desactivação de fluorescência de sondas fluorescentes da série do ácido *n*-(9-antroiloxi)-esteárico (*n*-AS; *n* = 2, 6, 9 ou 12), cujos grupos fluoróforos estão localizados a diferentes profundidades da bicamada lipídica, permitiu ainda inferir acerca da localização dos fármacos nas membranas.

O efeito da interacção dos AINEs em estudo com os lipossomas de EPC nas propriedades físico-químicas destes foi avaliado por metodologias de determinação do tamanho e do potencial-zeta dos LUVs e por anisotropia de fluorescência de estado

estacionário. A determinação do tamanho e do potencial-zeta dos LUVs permitiu avaliar se ocorria aumento do diâmetro e/ou alteração da carga superficial da bicamada lipídica dos lipossomas, na presença de concentrações crescentes de fármaco. Pelos ensaios de anisotropia de fluorescência de estado estacionário, com as sondas da série *n*-AS (*n* = 2, 6, 9 ou 12), investigou-se as alterações de fluidez membranar provocadas pelos AINEs.

Este estudo envolveu ainda a avaliação da actividade antioxidante dos AINEs diclofenac, clonixina, piroxicam, tenoxicam, etodolac e indoprofeno face a diferentes radicais livres e também relativamente a um mesmo radical gerado em diferentes locais, nomeadamente na fase aquosa e no interior da membrana. Os radicais livres sobre os quais se avaliou a actividade antioxidante dos AINEs foram os radicais estáveis do ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS^{•+}) e do 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH[•]), o radical peroxilo (ROO[•]) e o radical hidroxilo (HO[•]).

A avaliação da capacidade de captação dos AINEs face aos radicais ABTS^{•+} e DPPH[•] foi efectuada espectrofotometricamente, em solução etanólica.

Foi avaliada também a capacidade protectora dos fármacos contra os danos oxidativos passíveis de ocorrer na biomolécula de ADN. A quantificação, por HPLC, da 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OH-2'-dG), formada por oxidação da base 2'-desoxiguanosina (2'-dG) na presença dos radicais hidroxilo, gerados pelo sistema Fe³⁺-EDTA/H₂O₂/ácido ascórbico, permitiu avaliar a capacidade protectora dos AINES contra esses danos oxidativos. A realização deste ensaio na ausência de ácido ascórbico permitiu ainda avaliar a actividade pró-oxidante dos AINEs.

A actividade antioxidante dos AINEs na inibição da peroxidação lipídica induzida pelos radicais peroxilo, gerados na fase aquosa pelo dicloridrato de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (AAPH) e no interior da membrana pelo 2,2'-azobis(2,4-dimetilvaleronitrilo) (AMVN), foi avaliada pela monitorização da oxidação de diferentes sondas fluorescentes, nomeadamente a fluoresceína, a 5-hexadecanoilaminofluoresceína (HDAF) e o ácido 3-(*p*-(6-fenil)-1,3,5-hexatrienil)fenilpropiónico (DPH-PA). A utilização dos iniciadores AAPH e AMVN com lipossolubilidades distintas permitiu avaliar não apenas a reactividade intrínseca de um antioxidante, mas também determinar se a posição e orientação do fármaco na membrana, assim como a alteração de propriedades físico-químicas membranares, como a fluidez, contribuíam significativamente para a

actividade antioxidante observada. Adicionalmente, a monitorização da intensidade de fluorescência (ou da anisotropia de fluorescência nos ensaios com a sonda DPH-PA) destas sondas fluorescentes com diferentes localizações relativamente à membrana permitiu avaliar a actividade antioxidante dos AINEs a esses diferentes níveis.

Finalmente, a actividade antioxidante dos AINEs foi também avaliada face à peroxidação lipídica iniciada pelo radical $\text{HO}^\bullet$ pela monitorização da intensidade de fluorescência da sonda DPH-PA. Os radicais $\text{HO}^\bullet$ foram gerados pelo sistema $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$, na fase aquosa.

Os resultados obtidos mostraram que a eficácia antioxidante dos AINEs apresentava diferenças significativas relativamente à espécie reactiva em questão, o que tornou necessário a reunião de várias metodologias para uma melhor compreensão do mecanismo de acção de um determinado fármaco.

Na tentativa de obter uma melhor correlação da acção farmacológica dos fármacos com os efeitos moleculares a nível das membranas biológicas realizaram-se alguns estudos com esplenócitos. Esses estudos compreenderam a avaliação dos efeitos dos AINEs na fluidez membranar e da actividade antioxidante desses mesmos fármacos face aos radicais peróxido. A alteração da fluidez membranar dos esplenócitos foi avaliada por anisotropia de fluorescência de estado estacionário, na presença da sonda 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) e de concentrações crescentes dos AINEs diclofenac, clonixina, piroxicam, tenoxicam, etodolac, indoprofeno e indometacina. Por outro lado, a monitorização da intensidade de fluorescência da sonda DPH-PA e da fluidez membranar por anisotropia de fluorescência permitiu avaliar a actividade antioxidante dos anti-inflamatórios em estudo face à peroxidação lipídica induzida pelos radicais peróxido gerados pelo AAPH.

ABSTRACT

The experimental work carried out in the context of the present dissertation was centered in the study of the interaction of six non-steroidal anti-inflammatory drugs, namely diclofenac, clonixin, piroxicam, tenoxicam, etodolac and indoprofen with biomembrane models. It was also studied the effects of this interaction on the physical and chemical properties of the membrane lipid bilayer and in the therapeutic activity of the drugs, namely their antioxidant activity. The biomembrane models used were egg yolk phosphatidylcholine (EPC) unilamellar liposomes (LUVs). Some studies were also performed with splenocytes isolated from mouse spleen.

The partition equilibrium of the drugs between liposomes and aqueous solution was quantified by the partition coefficient, K_p , at pH 7.4, using three different methodologies, namely derivative spectrophotometry, fluorescence quenching and zeta-potential. These three techniques yielded similar results. For the anti-inflammatory drugs diclofenac and clonixin, the liposome/water partition coefficient was also evaluated at pH 3.0 and 10.3 and, additionally, their partition coefficient was quantified using EPC liposomes containing cholesterol at a percentage of 10 and 40%, at pH 7.4.

Fluorescence quenching of fluorescent probes from a series of *n*-(9-anthroyloxy) stearic acids (*n*-AS, *n* = 2, 6, 9 and 12), which contain the fluorophores located at different depths of the lipid bilayer, also allowed the determination of the location of the drugs in the membrane.

The effect of the interaction of the NSAIDs in study with EPC liposomes on its physical and chemical properties was analysed by determining the LUVs size and the zeta-potential and by steady-state fluorescence anisotropy measurements. The determination of LUVs size and zeta-potential allowed to estimate if the liposomes increased in diameter and/or if its surface charge was altered in the presence of different drug concentrations. Steady-state fluorescence anisotropy measurements,

using a set of *n*-AS probes (*n* = 2, 6, 9 and 12), gave an insight of the membrane fluidity variation induced by NSAIDs.

This study also evaluated the antioxidant activity of diclofenac, clonixin, piroxicam, tenoxicam, etodolac and indoprofen against different free radicals and also when the same free radical were generated within the lipid or the aqueous environment surrounding the LUVs. The protective effect of NSAIDs were evaluated against stable radicals of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS^{•+}) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH[•]), peroxy radicals (ROO[•]) and hydroxyl radicals (HO[•]).

The NSAIDs scavenging capacity against the ABTS^{•+} and DPPH[•] radicals was evaluated by a spectrophotometric method, in an ethanol solution.

The protective capacity of the drugs against the oxidative damage in DNA biomolecule was also estimated. The quantification, by HPLC, of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-2'dG), the product of the oxidation of 2'-deoxyguanosine (2'-dG) by hydroxyl radicals, generated by Fe³⁺-EDTA/H₂O₂/ascorbic acid system, allowed to evaluate the NSAIDs protective capacity against these oxidative damages. Assays on the oxidation of the 2'-dG in the absence of ascorbic acid were performed to evaluate the prooxidant capacity of the NSAIDs.

The NSAIDs antioxidant activity on lipid peroxidation induced by peroxy radicals, generated in the aqueous environment by 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) and within the membranes by 2,2'-azobis (2,4-dimethylvaleronitrile) (AMVN), was measured by monitoring the oxidation of different fluorescent probes, namely fluorescein, 5-hexadecanoylamino fluorescein (HDAF) and 3-(*p*-(6-phenyl)-1,3,5-hexatrienyl)phenylpropionic acid (DPH-PA). The use of AAPH and AMVN as radical initiators with different lipid solubilities allowed to measure not only the intrinsic scavenging ability of the antioxidant, but also to determine if the drug position and orientation in the membrane, as well as the modification of the membrane properties, as membrane fluidity, significantly contribute to the observed antioxidant activity. Additionally, the monitoring of the fluorescence intensity (or fluorescence anisotropy in the assays with the DPH-PA probe) of these fluorescent probes with different locations relatively to the membrane allowed to evaluate the NSAIDs antioxidant activity at these different levels.

Finally, the antioxidant activity of the NSAIDs was also evaluated against lipid peroxidation induced by HO[•] radicals by monitoring the fluorescence of the DPH-PA probe. HO[•] radicals were produced by the Fe²⁺/H₂O₂ system, in the aqueous phase.

The results obtained showed that the antioxidant efficiency of the NSAIDs exhibited significant differences with regard to the reactive species in question, which determines the need to combine several methodologies for a better understanding of the mechanism of action of any antioxidant.

For a better correlation of the pharmacological action of drugs with molecular effects at the cellular membrane level some studies were performed with splenocytes. These studies are characterized by the evaluation of the effects on membrane fluidity induced by NSAIDs and their antioxidant activity against peroxy radicals. The splenocyte membrane fluidity was estimated by steady-state fluorescence anisotropy measurements, in the presence of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) probe and increasing concentrations of diclofenac, clonixin, piroxicam, tenoxicam, etodolac, indoprofen and indomethacin. On the other side, the monitoring of DPH-PA fluorescence intensity and of membrane fluidity by fluorescence anisotropy allowed to evaluate the NSAIDs antioxidant activity against lipid peroxidation induced by peroxy radicals generated by AAPH.

RÉSUMÉ

Les travaux expérimentaux réalisés dans le cadre de cette dissertation concernent l'étude de l'interaction de six anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINSs), à savoir : le diclofenac, la clonixine, le piroxicam, le tenoxicam, l'etodolac et l'indoprofène, avec des modèles membranaires. L'influence de ces interactions sur les propriétés physico-chimiques des membranes et sur l'activité thérapeutique de ces composés pharmaceutiques, leur efficacité comme antioxydants par exemple, a également été étudiée. Les modèles membranaires utilisés étaient des liposomes unilamellaires (LUVs) de phosphatidilcholine du jaune d'œuf (EPC). Certaines études ont également été réalisées en présence de leucocytes isolés de la rate de souris.

L'équilibre de partition des composés pharmaceutiques entre les liposomes et la solution aqueuse a été quantifié par le coefficient de partition, K_p , à une valeur de pH égale à 7.4, recourant à trois méthodologies différentes: la spectrophotométrie dérivative, le potentiel-zeta et la désactivation de la fluorescence. Les trois méthodologies ont permis d'obtenir des résultats concordants. Pour les anti-inflammatoires diclofenac et clonixine, le coefficient de partition liposomes/solution aqueuse a aussi été déterminé à des valeurs de pH égales à 3.0 et 10.3 ; et, la quantification du coefficient de partition utilisant des liposomes de EPC ayant du cholestérol dans sa constitution à des pourcentages de 10 et 40 %, à une valeur de pH égale à 7.4, a également été effectuée.

La désactivation de la fluorescence de sondes fluorescentes de la série de l'acide *n*-(9-anthroyloxy) stéarique (*n*-AS, *n* = 2, 6, 9 et 12), localisées en différents lieux de la bicouche lipidique, a encore permis de conclure quant à la localisation des composés pharmaceutiques dans les membranes.

L'effet de l'interaction des AINSs étudiés sur les propriétés physico-chimiques des liposomes de EPC a été évalué par la détermination de la taille et du potentiel-zeta des LUVs et par anisotropie de fluorescence de l'état stationnaire. La détermination de

la taille et du potentiel-zeta des LUVs a permis d'évaluer une altération du diamètre et/ou de la charge superficielle de la bicouche lipidique des liposomes en présence de concentrations croissantes de composés pharmaceutiques. Les essais d'anisotropie de fluorescence de l'état stationnaire, avec les sondes de la série *n*-AS (*n* = 2, 6, 9 ou 12), ont permis d'investiguer les altérations de la fluidité de la membrane provoquées par les AINSs.

Cette étude a encore impliqué l'évaluation de l'activité antioxydante des AINSs diclofenac, clonixine, piroxicam, tenoxicam, etodolac et indoprofène par rapport à différents radicaux libres et aussi par rapport à un radical libre généré en différents lieux: soit dans la phase aqueuse, soit dans la membrane. Les radicaux libres utilisés étaient: l'acide 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS^{•+}), le 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]), le radical peroxyde (ROO[•]) et le radical hydroxyle (HO[•]).

L'évaluation de la capacité antioxydante des AINSs par rapport aux radicaux ABTS^{•+} et DPPH[•] a été effectuée spectrophotométriquement, en solution éthanolique.

La capacité protectrice des composés pharmaceutiques contre les dommages oxydatifs auxquels la molécule de ADN est passible d'être exposée a également été évaluée. La quantification, par HPLC, de la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OH-2'-dG), formée par l'oxydation de la 2'-déoxyguanosine (2'-dG) en présence des radicaux hydroxyles, générés par le système Fe³⁺-EDTA/H₂O₂/acide ascorbique, a permis d'évaluer la capacité protectrice des AINSs contre ces dommages oxydatifs. La réalisation de ces essais en l'absence d'acide ascorbique a permis d'évaluer l'activité pro-oxydante des AINSs.

L'activité antioxydante des AINSs comme inhibiteurs de la peroxydation lipidique induite par les radicaux peroxydes, générés dans la phase aqueuse par le dichlorhydrate de 2,2'-Azobis (2-amidinopropane) (AAPH) et à l'intérieur de la membrane par le 2,2'-azobis(2,4-diméthylvaléronitrile) (AMVN), a été évaluée par le suivi de l'oxydation de différentes sondes fluorescentes, à savoir : la fluoresceine, la 5-hexadécanoylamino fluoresceine (HDAF) et l'acide diphenylhexatriène propionique (DPH-PA). L'utilisation des initiateurs AAPH et AMVN, dont les liposolubilités sont distinctes, a permis d'évaluer non seulement la réactivité intrinsèque d'un antioxydant, mais aussi de déterminer si la position et l'orientation des composés pharmaceutiques dans la membrane, ainsi que l'altération des propriétés physico-chimiques membranaires, comme la fluidité, contribuaient significativement à une activité antioxydante observée. En plus, le suivi de l'intensité de la fluorescence (ou de

l'anisotropie de fluorescence dans les essais avec la sonde DPH-PA) de ces sondes fluorescentes de différentes localisations relativement à la membrane a permis d'évaluer l'activité antioxydante des AINSs à ces différents niveaux.

Finalement, l'activité antioxydante des AINSs a également été évaluée relativement à la peroxydation lipidique, initiée par le radical $\text{HO}^\bullet$, par le suivi de l'intensité de la fluorescence de la sonde DPH-PA. Les radicaux $\text{HO}^\bullet$ ont été générés par le système $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ en phase aqueuse.

Les résultats obtenus ont montré que l'efficacité antioxydante des AINSs présentait des différences significatives relativement à l'espèce réactive en question, ce qui a nécessité l'utilisation de plusieurs méthodologies pour une meilleure compréhension du mécanisme d'action d'un composé pharmaceutique déterminé.

En vue d'obtenir une meilleure corrélation de l'action pharmacologique des composés pharmaceutiques avec les effets moléculaires au niveau des membranes biologiques, des études avec des leucocytes ont été réalisées. Ces études ont porté sur l'évaluation des effets des AINSs sur la fluidité membranaire et sur l'activité antioxydante de ces mêmes composés pharmaceutiques relativement aux radicaux peroxydes. L'altération de la fluidité membranaire des leucocytes a été évaluée par l'anisotropie de fluorescence de l'état stationnaire, en présence de la sonde 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène (DPH) et de concentrations croissantes des AINSs diclofenac, clonixine, piroxicam, tenoxicam, etodolac, indoprofène e indometacine. D'un autre côté, le suivi de l'intensité de la fluorescence de la sonde DPH-PA et de la fluidité membranaire par anisotropie de fluorescence a permis évaluer l'activité antioxydante des anti-inflammatoires étudiés relativement à la peroxydation lipidique initiée par les radicaux peroxydes générés par le AAPH.

INTRODUÇÃO GERAL

I. ENQUADRAMENTO E OBJECTIVOS GERAIS

A cura, debelando a doença, o prolongamento da vida, a conservação da juventude e a prevenção da doença são preocupações marcantes que, há muito, ditam as tendências na investigação científica. De facto, como Platão disse a Sócrates, na obra *Górgias*: “Haverá para o Homem um bem mais precioso do que a saúde?” A resposta é demasiado evidente e sem dúvida que esta reflexão filosófica condicionou o pensamento farmacêutico ao longo dos tempos.

Nos primórdios, a cura estava relacionada com o explorar dos potenciais terapêuticos das plantas, ditas medicinais, mas a evolução científica permitiu a descoberta de soluções alternativas, como os medicamentos. Com efeito, tem-se vindo a assistir à descoberta de inúmeros fármacos e novas formulações farmacêuticas, que têm como objectivo final o aumento da eficácia terapêutica e a diminuição dos efeitos secundários indesejáveis. Observa-se ainda o aperfeiçoamento e desenvolvimento de técnicas capazes de permitir um estudo mais aprofundado do mecanismo de acção dos fármacos. Este último aspecto está intimamente dependente da sua estrutura química e, em última análise, com a capacidade que essa estrutura lhe confere para interactuar com sistemas biológicos, como por exemplo, receptores e membranas celulares. As membranas celulares, basicamente constituídas por uma dupla camada fosfolipídica, são sistemas de particular importância, uma vez que condicionam a concentração de fármaco num determinado ponto do organismo, além de poderem ter um papel primordial no seu mecanismo de acção. As relações que se possam estabelecer entre o mecanismo de acção de um fármaco e o seu comportamento face às membranas biológicas permitirá ainda estabelecer uma relação causa-efeito entre as características físico-químicas dos compostos e os respectivos perfis farmacológicos, de tal modo que será possível desenvolver o

conceito da relação estrutura-actividade, de forma a criar novos compostos com maior eficácia terapêutica e com menores efeitos secundários indesejáveis.

Os lipossomas, devido à sua composição e organização, constituem modelos membranares preciosos para o estudo da interacção dos fármacos com as membranas. A partir da informação retirada com estes sistemas podem usar-se sistemas de maior complexidade, como células ou tecidos, para uma melhor percepção dos fenómenos envolvidos.

Do exposto se depreende a importância do estudo da interacção dos fármacos com as membranas dos lipossomas ou celulares, o que constitui o objectivo desta dissertação. De facto, com o trabalho desenvolvido nesta dissertação pretende-se fornecer uma contribuição para o conhecimento das características da interacção dos AINEs diclofenac, clonixina, etodolac, indoprofeno, piroxicam e tenoxicam com as membranas fosfolipídicas, para que mais informação seja disponibilizada na análise e clarificação do papel destes fármacos, ainda não completamente esclarecido, no ambiente fisiológico. Com efeito, apesar de toda a investigação levada a cabo nos últimos anos, existem ainda algumas lacunas no que respeita ao conhecimento das interacções físico-químicas a nível molecular entre os fármacos estudados e as membranas, bem como estudos referentes à sua localização membranar e actividade antioxidante, tópicos que constituem o tema deste trabalho de investigação. Foram também realizados alguns estudos com células de modo a obter uma melhor correlação com o que poderá realmente ocorrer *in vivo* e para validar a utilização dos lipossomas como modelos a usar no estudo das interacções fármaco/membrana.

II. ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação encontra-se organizada em 6 capítulos. O primeiro, designado **Introdução**, consiste num enquadramento teórico em que se descreve conceitos fundamentais para a compreensão do trabalho experimental realizado. É efectuada uma descrição de aspectos essenciais dos lipossomas, nomeadamente das suas propriedades físico-químicas e estruturais, e das principais características dos fármacos estudados, dando especial ênfase ao seu mecanismo de acção. Finalmente, descreve-se a importância do estudo das interacções que se podem estabelecer entre os fármacos e os lipossomas.

No capítulo 2, **Preparação e caracterização das amostras**, é descrito o método de preparação dos lipossomas de fosfatidilcolina da gema de ovo, bem como a sua caracterização quanto ao tamanho, potencial-zeta, estabilidade e concentração. Descreve-se ainda a preparação das soluções dos fármacos e das amostras em que pode ocorrer interacção entre lipossomas e AINEs.

No capítulo 3, **Avaliação da interacção de anti-inflamatórios não esteróides com lipossomas**, referenciam-se os métodos experimentais utilizados para determinar o coeficiente de partição do fármaco entre uma fase aquosa e os lipossomas, a localização membranar dos fármacos e os efeitos resultantes da interacção fármaco/lipossoma nas propriedades físico-químicas das membranas lipídicas, nomeadamente no tamanho, no potencial e na fluidez da membrana.

No capítulo 4, **Avaliação da actividade antioxidante dos anti-inflamatórios não esteróides**, são apresentadas as várias metodologias utilizadas para a avaliação da actividade antioxidante dos fármacos face a diferentes radicais livres ou a um mesmo radical gerado em locais distintos.

No capítulo 5, **Avaliação da actividade antioxidante e dos efeitos dos AINEs na fluidez membranar de esplenócitos usados como modelos das biomembranas**, são apresentados os estudos realizados com esplenócitos, nomeadamente a avaliação da alteração da fluidez membranar resultante da interacção fármaco/esplenócitos e a determinação da actividade antioxidante dos fármacos face à peroxidação lipídica iniciada pelo radical peróxido.

Finalmente, no capítulo 6, **Considerações finais e perspectivas futuras**, apresentam-se as considerações finais acerca dos resultados experimentais obtidos nos vários estudos e referem-se trabalhos de investigação que poderão ser efectuados na continuação dos descritos nesta dissertação.

ABREVIATURAS

Å: angstroms;

AAPH: dicloridrato de 2,2'-azobis-2-amidinopropano;

ABTS: ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico);

ADN: ácido desoxirribonucleico;

AINEs: anti-inflamatórios não esteróides;

AMVN: 2,2'-azobis (2,4-dimetilvaleronitrilo);

ARN: ácido ribonucleico;

AUC: área sob a curva;

C: concentração

COX: ciclooxigenase;

2'-dG: 2'-desoxiguanosina;

DMPC: dimiristoilfosfatidilcolina;

DMSO: dimetilsulfóxido;

DPH: 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno;

DPH-PA: ácido 3-(*p*-(6-fenil)-1,3,5-hexatrienilfenil)propiónico;

DPPC: dipalmitoilfosfatidilcolina;

DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo;

DSC: calorimetria diferencial de varrimento;

EDTA: ácido etilenodiaminotetraacético;

EPC: fosfatidilcolina da gema de ovo;

EPR: ressonância paramagnética electrónica;

ϵ : absorvidade molar;

Fe²⁺: ião ferro (II);

Fe³⁺: ião ferro (III);

H: átomo de hidrogénio;

H⁺: catião de hidrogénio;

HDAF: 5-hexadecanoilaminofluoresceína;

HIV: vírus da imunodeficiência humana;

HO[•]: radical hidroxilo;

H₂O₂: peróxido de hidrogénio;

HOCl: ácido hipocloroso;

HOO[•]: radical perhidroxilo;

HPLC: cromatografia líquida de alta pressão;

I: intensidade de fluorescência;

I: força iónica;

IC_x: concentração de composto necessária para ocorrer uma inibição de x%;

K_{o/a}: coeficiente de partição octanol/água;

K_p: coeficiente de partição;

K_q: constante bimolecular de desactivação de fluorescência;

K_q^{app}: constante bimolecular aparente de desactivação de fluorescência;

K_{SV}: constante de Stern-Volmer;

K_{SV}^{app}: constante aparente de Stern-Volmer;

L[•]: radical alquilo;

LDL: lipoproteína de baixa densidade;

LH: ácidos gordos polinsaturados;

LOO[•]: radical peroxilo lipídico;

LO[•]: radical alcoxilo;

LTs: leucotrienos;

LUVs: lipossomas unilamelares grandes;

λ: comprimento de onda;

λ_{max}: comprimento de onda máximo de absorção;

M: metais de transição;

min: minutos;

n-AS: ácido *n*-(9-antroxilo)-esteárico;

nm: nanómetros;

MLVs: lipossomas multilamelares;

μm: micrómetros;

O₂: oxigénio;

O₂⁻: anião superóxido;

8-OH-2'-dG: 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina;
PGs: prostaglandinas;
pK_a: constante de acidez;
Ψ₀: potencial de superfície;
r: anisotropia;
r': valores de anisotropia corrigidos;
r_{ss}: valores de anisotropia experimentais;
RMN: ressonância magnética nuclear;
ROO•: radical peroxilo;
ROOH: hidroperóxido orgânico;
ROS: espécies reativas de oxigênio;
RNS: espécies reativas de azoto;
s: segundos;
SRE: sistema retículo-endotelial;
SUVs: lipossomas unilamelares pequenos;
σ: densidade de carga superficial;
σ*: número de moléculas adsorvidas por unidade de área;
T_c: temperatura de transição de fase;
TEAC: capacidade antioxidante equivalente ao trolox;
TXs: tromboxanos;
τ: tempo de vida no estado excitado;
θ: tempo de relaxamento rotacional;
UV/Vis: ultravioleta/visível;
V: volume;
ζ: potencial-zeta.

CAPÍTULO 1
INTRODUÇÃO

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

1.1. LIPOSSOMAS

Os lipossomas, ou vesículas lipídicas, são estruturas esféricas fechadas, constituídas por fosfolípidos anfipáticos, os quais são caracterizados por possuírem um grupo hidrofílico ligado a duas cadeias hidrofóbicas, podendo também incluir outros componentes membranares, como o colesterol [1, 2]. Os lípidos anfipáticos, também denominados anfífilos, possuem a capacidade de espontaneamente formar agregados em bicamada quando dispersos em solução aquosa, envolvendo no seu interior um determinado volume do solvente. Estas estruturas fechadas podem ser constituídas por uma ou várias membranas concêntricas, variando o seu tamanho desde 20 nanómetros (nm) a alguns micrómetros (μm) de diâmetro, apresentando a membrana uma espessura aproximadamente igual a 4 nm [2].

Alec Bangham e colaboradores, em 1965, descreveram pela primeira vez a formação espontânea de estruturas membranares fechadas, num trabalho de investigação acerca da difusão de iões através de membranas lipídicas artificiais [3]. A este sistema de vesículas fosfolipídicas foi dado, três anos mais tarde, o nome de lipossomas. O termo lipossoma foi introduzido por Weissmann, que reuniu numa só palavra dois elementos de origem grega: *lipo*, que significa gordura, e *soma*, que significa corpo [4]. No entanto, estas estruturas multilamelares obtidas da hidratação de fosfolípidos já eram anteriormente conhecidas, sendo denominadas “figuras de mielina” [3]. De facto, em 1947, Bernard postulou a existência de lipossomas, quando analisava resultados de estudos microscópicos sobre “figuras de mielina”, formadas em sistemas oleato de amónio-água [5].

A investigação realizada com lipossomas tem vindo a expandir-se, após a sua descoberta por Alec Bangham e colaboradores, tendo-se centrado inicialmente na sua utilização como modelos membranares em várias áreas como a farmacêutica, médica

e bioquímica, nas quais, ainda hoje, ocupam lugar de grande relevo. Contudo, pouco depois da descoberta dos lipossomas, surgiu a hipótese de que estas estruturas poderiam ser utilizadas para muitas outras finalidades, como por exemplo, para transporte de fármacos [1, 3, 5]. Com efeito, durante o século XX houve um grande esforço no sentido de desenvolver um sistema capaz de transportar compostos terapêuticos (fármacos, em especial os anti-tumorais, antibióticos, enzimas, hormonas ou agentes quelantes) até um alvo específico (órgão, tecido ou célula). As primeiras tentativas para a obtenção de um sistema transportador eficaz tiveram como base o encapsulamento das biomoléculas a transportar em vesículas de nylon e outros polímeros sintéticos. No entanto, esta abordagem mostrou-se totalmente inadequada, visto estas vesículas de material artificial se acumularem dentro do organismo [3]. Assim, em 1971, Gregory Gregoriadis propôs, pela primeira vez, a utilização dos lipossomas como sistema transportador de fármacos, mantendo, desde então, um papel preponderante no desenvolvimento desta área [3].

Os lipossomas apresentam como propriedades fundamentais: a) o fornecimento simultâneo de um meio lipofílico e de um meio aquoso, possibilitando a imobilização de qualquer tipo de substância independentemente da sua solubilidade, carga eléctrica ou peso molecular; b) a possibilidade de caracterização físico-química e de controlo das suas propriedades através de variações na composição e método de preparação; c) a possibilidade de libertação controlada do seu conteúdo para os fluidos biológicos ou para as células, através de fusão ou endocitose, bem como de direccionamento *in vivo* por via intravenosa, ocular, pulmonar, nasal, oral, intramuscular, subcutânea e dérmica [6]. Assim, as características físico-químicas únicas dos lipossomas, associadas a uma grande versatilidade estrutural, explicam as grandes potencialidades destes meios organizados como modelos membranares e vectores de fármacos, que se traduzem num elevadíssimo número de estudos realizados com estes sistemas.

1.1.1. Considerações físico-químicas

Os fosfolípidos constituem os componentes lipídicos estruturais mais abundantes das membranas naturais e podem ser divididos em dois grupos: esfingolípidos e fosfoglicerídeos [2]. Os fosfoglicerídeos são derivados do glicerol, enquanto que os esfingolípidos são derivados da esfingosina (Figura 1.1). Como é

possível observar na Figura 1.1, os esfingolípidos, ao contrário dos glicerofosfolípidos, apresentam um único ácido gordo unido por uma ligação amida ao azoto da esfingosina, a qual, por sua vez, se encontra ligada ao ácido fosfórico. Este pode-se encontrar ligado a uma molécula polar, nomeadamente à colina, etanolamina, inositol ou glicerol [1, 2].

Os fosfoglicerídeos consistem numa parte central, constituída por glicerol, conjugada com uma parte hidrófoba e uma parte hidrófila. A parte hidrófoba é formada por duas cadeias hidrocarbonadas de ácidos gordos saturados ou insaturados, que esterificam igual número de grupos hidroxilo do glicerol, apresentando cada cadeia 10 a 28 átomos de carbono [5]. Enquanto que as cadeias hidrocarbonadas ocupam normalmente a posição 1 e 2 da molécula do glicerol, a parte hidrófila encontra-se esterificada no terceiro hidroxilo do glicerol e é composta por uma molécula de ácido fosfórico (no caso do ácido fosfatídico) ou por ácido fosfórico covalentemente ligado a diferentes moléculas hidrossolúveis [1]. As moléculas hidrossolúveis, mais frequentemente encontradas nos fosfolípidos de origem natural, são a colina, o glicerol, o inositol, a serina ou a etanolamina (Figura 1.1). Assim, conforme as respectivas moléculas, os fosfoglicerídeos podem ser electricamente neutros ou apresentar carga negativa [1, 2].

Todos os fosfolípidos de origem natural exibem, geralmente, uma grande heterogeneidade relativamente às cadeias hidrocarbonadas dos ácidos gordos que os constituem, ao contrário dos fosfolípidos sintéticos que podem apresentar uma constituição muito homogénea. Adicionalmente, os ácidos gordos sintetizados no organismo apresentam um número par de carbonos na sua cadeia, enquanto que os ácidos gordos obtidos por síntese podem possuir um número ímpar desses átomos [1].

Os ácidos gordos saturados mais frequentes nas membranas naturais são o mirístico, o palmítico e o esteárico, com 12, 14 e 16 átomos de carbono, respectivamente, enquanto que dos insaturados o mais importante é o ácido oleico, com 18 átomos de carbono e uma ligação dupla. Os ácidos gordos saturados são muito flexíveis, possuindo cada ligação a possibilidade de rotação, ao contrário dos insaturados que são moléculas mais rígidas. A ligação dupla *cis*, muito mais comum, provoca uma conformação com um ângulo de cerca de 30°, o que dificulta o empacotamento destas moléculas na bicamada, enquanto que a configuração *trans* assemelha-se à forma estendida dos ácidos gordos saturados [1].

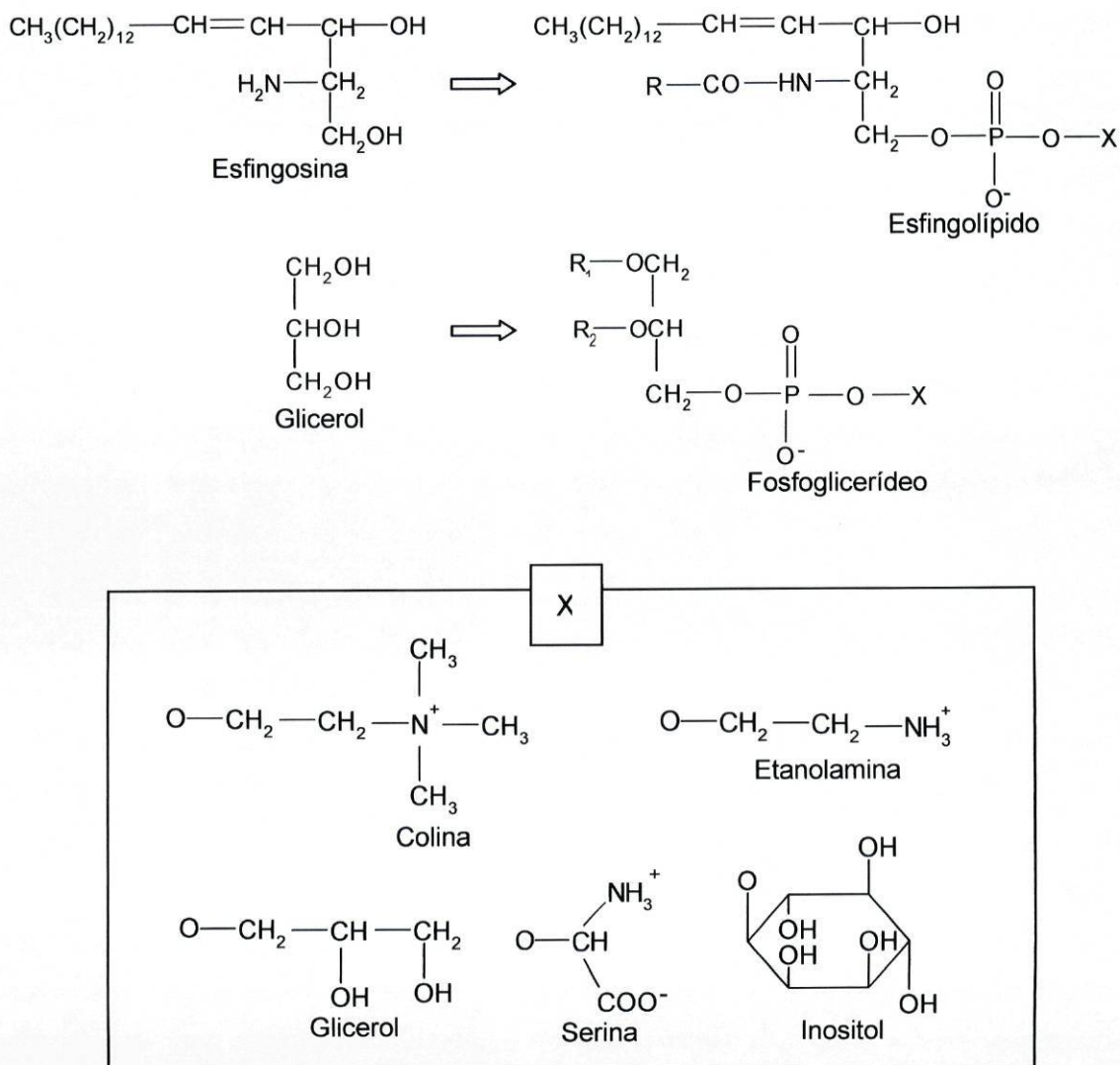


Figura 1.1: Estrutura química do glicerol, da esfingosina e dos fosfolípidos deles derivados. X representa os principais grupos polares encontrados nos fosfolípidos de origem natural.

Muitas das propriedades físicas dos lipossomas, como a sua estabilidade, permeabilidade, ordem das cadeias hidrocarbonadas ou temperatura de transição de fase, dependem do comprimento e grau de saturação dos fosfolípidos que os constituem. Os glicerofosfolípidos, frequentemente designados de fosfolípidos, naturais possuem geralmente uma cadeia saturada ligada à posição 1 do esqueleto do glicerol e uma cadeia insaturada ou mais longa ligada à posição 2 [1].

Os fosfolípidos mais abundantes na natureza e indubitavelmente os mais usados na preparação de lipossomas são os que contêm colina [1]. Denominam-se de fosfatidilcolinas ou lecitinas (de "lekithos", palavra grega que significa gema do ovo) e são moléculas dipolares a pH fisiológico, com o grupo amónio quaternário

apresentando carga positiva e o grupo fosfato carga negativa. Com exceção da fosfatidilcolina e da fosfatidiletanolamina, todos os outros fosfolípidos apresentam carga negativa, o que constitui uma das razões para as membranas biológicas exibirem geralmente uma carga superficial negativa, importante para muitos processos biológicos [2].

Cada classe de um tipo de fosfolípido, por exemplo de fosfatidilcolina ou fosfatidiletanolamina, compreende uma grande variedade de moléculas, conforme o tipo de ácidos gordos ligados ao esqueleto do glicerol. A lecitina de origem natural, como a extraída da gema de ovo ou soja, é uma mistura de várias moléculas, com cadeias carbonadas de diversos comprimentos e diferentes graus de saturação. O ácido gordo mais abundante na lecitina da gema de ovo é o ácido palmítico (35,3%), situado preferencialmente na posição 1, seguido do ácido oleico, encontrado principalmente na posição 2 (Figura 1.2) [2]. Contudo, a lecitina também pode ser obtida por síntese, apresentando neste caso uma composição bem definida, particularmente no que concerne aos grupos acilo e podem ser obtidas com cadeias hidrocarbonadas saturadas ou insaturadas, com maior ou menor número de átomos de carbono, iguais ou diferentes. Este tipo de fosfolípidos, como DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina) ou DMPC (dimiristoilfosfatidilcolina), têm um comportamento facilmente caracterizável relativamente a diversos parâmetros termodinâmicos, comparativamente às populações heterogêneas que constituem os fosfolípidos naturais [1].

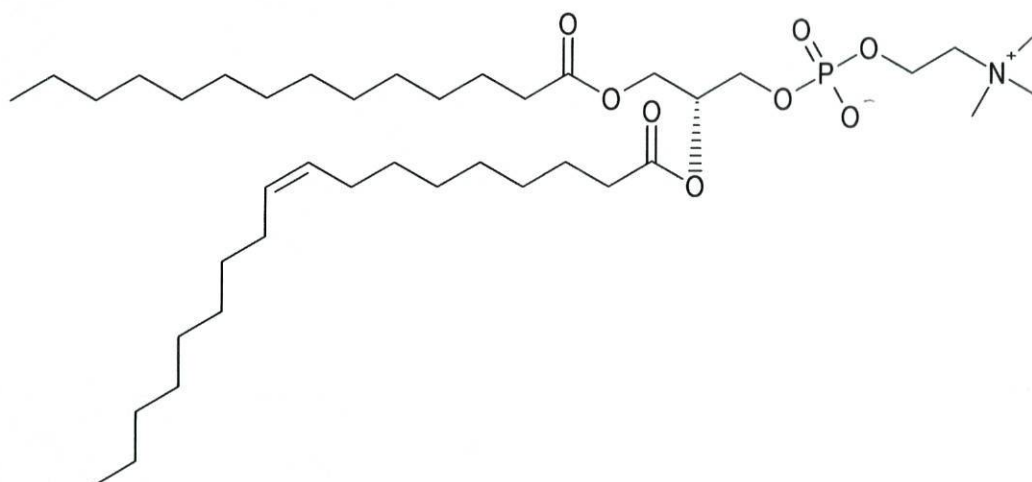


Figura 1.2: Estrutura química de uma molécula de lecitina.

A lecitina constitui o maior componente das membranas naturais, sendo, deste modo, utilizada frequentemente na preparação de lipossomas para as mais variadas aplicações. Origina lipossomas electricamente neutros, mas a carga destes pode ser modificada pela incorporação de moléculas anfipáticas carregadas, como o fosfatidilglicerol ou o fosfatidilinositol, para a obtenção de lipossomas carregados negativamente, ou a estearilamina para a obtenção de lipossomas com carga positiva [2].

Além dos fosfolípidos, os lipossomas também podem incluir outras moléculas lipídicas presentes nas membranas naturais, nomeadamente glicolípidos (Figura 1.3) e esteróis. Deste último grupo, o colesterol (Figura 1.3) é o representante mais importante e é usado, por exemplo, para reduzir a difusão dos fármacos hidrossolúveis para o exterior das vesículas, bem como para aumentar a estabilidade destas na corrente sanguínea. Na bicamada fosfolipídica, as moléculas de colesterol orientam o seu grupo hidroxilo para a fase aquosa, enquanto o núcleo, referente ao ciclopentanoperidrofenantreno, intercala-se nas cadeias acíclicas dos fosfolípidos. A quantidade de colesterol incluída na bicamada fosfolipídica é variável, podendo atingir cerca de 50% da composição lipídica total [7].

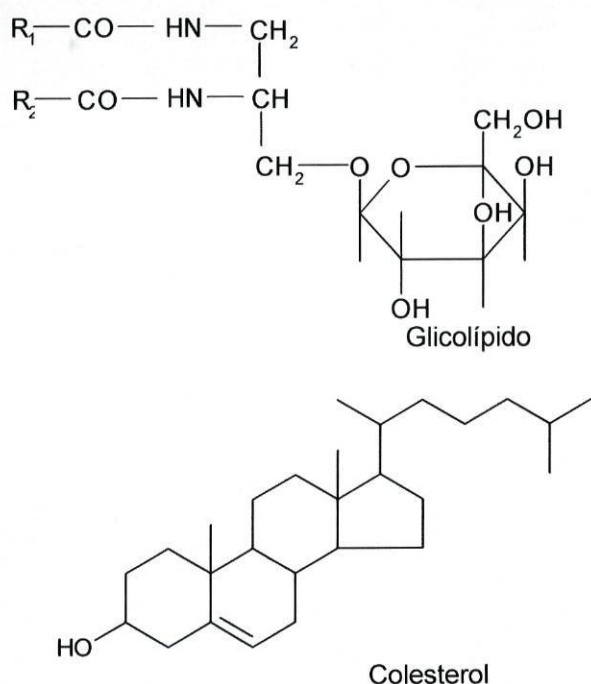


Figura 1.3: Estrutura química dos glicolípidos e de uma molécula do colesterol.

Uma das principais características físicas das bicamadas lipídicas é a existência de uma determinada temperatura onde a organização dos fosfolípidos sofre uma alteração. Assim, para diferentes valores de temperatura, as bicamadas lipídicas podem apresentar-se em duas fases termodinamicamente distintas, ocorrendo a transição de uma para a outra fase por variação da temperatura [2]. Deste modo, as bicamadas lipídicas podem apresentar-se numa fase de grande ordenação, designada por estado de gel-sólido e, para temperaturas mais elevadas, numa fase mais fluida denominada de cristal-líquido [1, 2], como está representado esquematicamente na Figura 1.4.

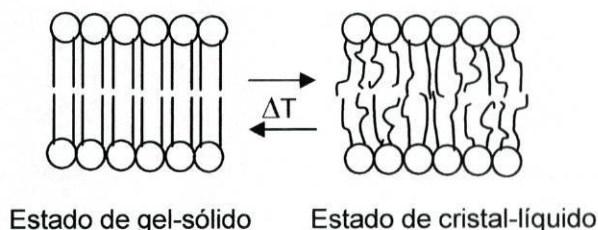


Figura 1.4: Representação esquemática da organização estrutural apresentada pelas cadeias hidrocarbonadas dos fosfolípidos no estado de gel-sólido e de cristal-líquido. ΔT corresponde à variação de temperatura.

A temperatura de passagem de uma fase à outra denomina-se temperatura de transição de fase, T_c , e é específica para um determinado lípido. Deste modo, quando a temperatura do sistema é inferior à T_c dos fosfolípidos constituintes de uma determinada bicamada, esta apresenta uma estrutura ordenada, em que as cadeias hidrocarbonadas se encontram numa conformação distendida e firmemente empacotadas, sendo a liberdade de movimentos muito restrita. Acima da T_c , aumenta consideravelmente a mobilidade das cadeias acíclicas na membrana, a área ocupada por cada molécula de fosfolípido é superior e a espessura da bicamada diminui [1, 2]. A T_c dos fosfolípidos depende da natureza do grupo polar, bem como do comprimento e grau de insaturação das cadeias acíclicas. Geralmente, aumenta com o comprimento das cadeias dos ácidos gordos e diminui com o grau de insaturação [2]. Enquanto que para membranas de composição homogênea é possível falar-se num valor de temperatura de transição de fase, para misturas de fosfolípidos a T_c compreende um intervalo de temperaturas. A amplitude deste intervalo depende fortemente da composição lipídica e pode abranger mais de 10°C , podendo mesmo

estar ausente em determinadas misturas de lípidos, como por exemplo, na presença de elevadas concentrações de colesterol (50%) [1, 2]. A T_c descrita para a DMPC é de 23,5°C e para a DPPC de 41,4°C, enquanto que a fosfatidilcolina da gema de ovo (EPC), sendo uma mistura heterógenea, apresenta uma temperatura de transição de -15 a -7°C [1, 2].

A fase em que as bicamadas lipídicas se encontram é extremamente importante, uma vez que determina diversas propriedades membranares, tais como permeabilidade, fusão, agregação, ligação de proteínas e funcionalidade das moléculas presentes, as quais, por sua vez, podem afectar marcadamente a estabilidade dos lipossomas e o comportamento destes nos sistemas biológicos. Todavia, o comportamento termodinâmico de uma bicamada lipossómica pode ser alterada quando se incorporam moléculas não fosfolipídicas na membrana. De facto, é bem conhecido o efeito do colesterol na modulação da fluidez membrana. Assim, quando as membranas se encontram na fase cristal-líquido, a interacção do colesterol com as cadeias hidrocarbonadas no estado fluido provoca um aumento da ordem e da densidade de empacotamento no interior da membrana, ou seja, aumenta a organização molecular, enquanto que no estado de gel-sólido, o colesterol exerce uma acção fluidificante. Com efeito, a presença de colesterol em elevadas concentrações (50%) pode suprimir a transição de fase, estando a membrana num amplo intervalo de temperatura numa conformação fluida e organizada com fortes forças coesivas [1, 2]. Consequentemente, a presença de colesterol na membrana aumenta a sua estabilidade, diminui a mobilidade das suas moléculas e reduz a sua permeabilidade. Devido a estas acções tão importantes, tem sido especulado, por alguns autores, que só após o aparecimento e inclusão do colesterol nas membranas lipídicas, é que estas se tornaram suficientemente fortes e coesivas na fase fluida para se poder observar os processos de endocitose e exocitose [1]. Nas membranas naturais, a razão de colesterol:lipido pode variar de 0,2 (por exemplo, membrana interna da mitocôndria) a 1 (por exemplo, membrana plasmática dos eritrócitos). Contudo, a fluidez das bicamadas lipídicas que não contêm colesterol na sua constituição, como as membranas das bactérias, pode ser controlada apenas pelo comprimento e insaturação das cadeias lipídicas hidrocarbonadas [5].

Deve-se ainda referir que o lipossoma só é formado quando os lípidos que o constituem são manipulados a uma temperatura superior à respectiva T_c . Este valor determina a temperatura mínima necessária para a água penetrar entre as camadas

lipídicas e os lipossomas se formarem. Contudo, após a preparação do lipossoma, a temperatura pode descer para além da T_c sem destruição do lipossoma [5].

1.1.1.1. Configuração e propriedades moleculares dos fosfolípidos

A estrutura e a dinâmica das moléculas fosfolipídicas apresentam um papel fundamental na funcionalidade das membranas biológicas. A compreensão dos fenómenos fisiológicos e da acção dos fármacos requer a descrição pormenorizada da estrutura da bicamada e das consequências dessa estrutura para a acção de moléculas endógenas e exógenas.

Nas membranas, as moléculas de fosfatidilcolina encontram-se alinhadas com o esqueleto do glicerol disposto de forma aproximadamente perpendicular ao plano da membrana e o grupo fosfocolina numa linha quase paralela (aproximadamente 30°) à superfície da membrana, conforme se pode visualizar na Figura 1.5 [2].

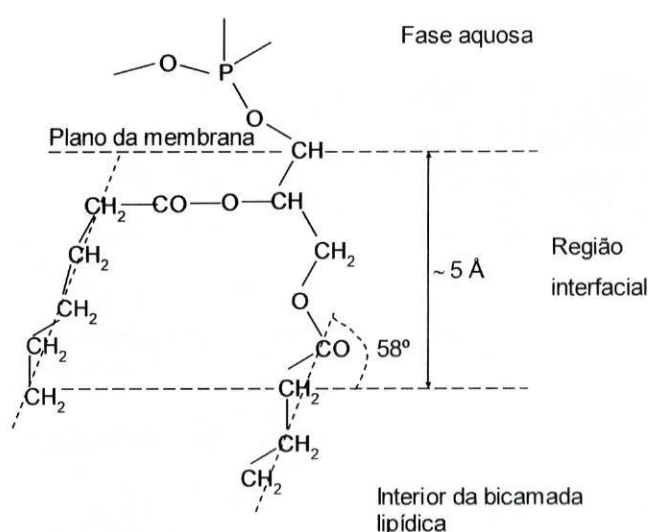


Figura 1.5: Representação esquemática da conformação da fosfatidilcolina na bicamada lipídica (adaptado de [2]).

Prevê-se que a conformação referida diminua a distância entre as cargas positiva e negativa na molécula e que seja também a adoptada pelo fosfatidilglicerol e pela fosfatidiletanolamina nas membranas biológicas [8].

O grupo polar dos fosfolípidos não parece ser dotado de grande liberdade de rotação, devido às ligações de hidrogénio que estabelece [9]. Contudo, diferentes grupos polares apresentam diferentes conformações e mobilidade, sendo, por exemplo, o grupo colina mais móvel do que o grupo da fosfatidiletanolamina [8]. A presença dos três grupos metilo ligados ao azoto quaternário implica que a colina, na conformação referida, se apresente numa forma muito compacta, ocupando uma área da membrana ($42 \text{ \AA}^2$) superior à área das duas cadeias hidrocarbonadas (aproximadamente $39 \text{ \AA}^2$). Para compensar este facto, as cadeias hidrocarbonadas deverão dispor-se numa conformação inclinada com um ângulo de 58° relativamente ao plano da membrana, de forma a preencher o espaço livre criado pelos grupos polares e a aumentar a proximidade entre as cadeias adjacentes, maximizando as interações de Van der Waals, assim como outras interações não covalentes (Figura 1.5) [2].

A inclinação das cadeias hidrocarbonadas, juntamente com o facto de que os dois primeiros átomos de carbono da cadeia hidrocarbonada na posição 2 estão dispostos paralelamente ao plano da membrana (Figura 1.5), implica que as lecitinas constituídas por cadeias hidrocarbonadas de igual comprimento terão lacunas no centro da bicamada lipídica, onde o grupo metilo terminal da cadeia 2 não consegue atingir. Nas lecitinas de origem natural, este problema é ultrapassado, uma vez que as cadeias hidrocarbonadas na posição 2 são usualmente mais compridas que as da posição 1 [2]. É de prever que os lipossomas constituídos por lípidos, cujas cadeias possuam comprimentos muito diferentes (por exemplo, cadeia na posição 2 com 10 átomos de carbono e cadeia na posição 1 com 18 átomos de carbono), apresentem bicamadas com intercalação das cadeias hidrocarbonadas dos folhetos opostos. Contudo, este comportamento é considerado excepcional, e para a maioria das fosfatidilcolinas naturais e sintéticas a bicamada pode ser considerada composta por dois folhetos independentes e desprovidos de interacção [2].

A parte da molécula fosfolipídica onde o movimento é mais restrito corresponde ao grupo glicerol. Os grupos metilo mais próximos do grupo polar também apresentam um elevado grau de rigidez, até à proximidade do carbono 9, e à medida que se vai percorrendo a cadeia a liberdade destes grupos vai aumentando [2]. Deste modo, a microviscosidade do meio vai diminuindo à medida que se progride para uma zona mais interna da bicamada [8], bem como a constante dieléctrica do meio, que diminui de cerca de 80 em solução aquosa para cerca de 30 perto dos grupos polares e 2,5 no interior das cadeias hidrocarbonadas, valores semelhantes aos encontrados nas

membranas biológicas [10]. No limite da membrana onde o compartimento lipídico se inter-relaciona com a fase aquosa, os limitados movimentos de rotação e a liberdade dos de translação, manifestam-se no alinhamento uniforme dos lípidos, com todas as moléculas adoptando uma mesma conformação e distância relativamente às outras [2].

O número de moléculas de água que hidratam os grupos polares dos fosfolípidos, assim como a força da interacção entre a água e os lípidos, influenciam fortemente a formação e as propriedades dos lipossomas. Tipicamente, uma molécula de fosfatidilcolina está associada a 23 moléculas de água. Destas, 11 moléculas estão situadas no interior da bicamada e 12 moléculas hidratam o grupo polar e podem, ainda, ser distribuídas por cinco classes de acordo com as interacções água/lípido: livres, fracamente ligadas, aprisionadas, ocupando a camada de hidratação principal ou ocupando a camada de hidratação interna (Figura 1.6). Estas últimas estão tão firmemente ligadas que não congelam, mesmo a temperaturas inferiores a zero [8].

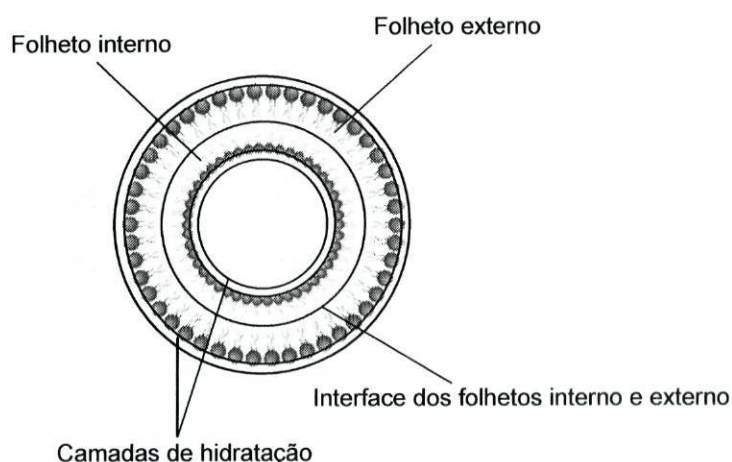


Figura 1.6: Representação esquemática das camadas de hidratação numa vesícula lipídica (adaptado de [8]).

O elevado grau de curvatura encontrado nas vesículas esféricas implica que a superfície externa seja maior que a superfície interna. Por exemplo, em lipossomas de fosfatidilcolina da gema de ovo, o folheto externo da bicamada apresenta uma espessura igual a 21 Å e o interno igual a 16 Å, sendo a espessura da bicamada anidra igual a 37 Å. Cada molécula de EPC apresenta um volume igual a 1253 Å³ e a área ocupada pelo seu grupo polar no folheto externo é de 74 Å² e no interno é igual a 61 Å² [8].

Embora a estrutura da bicamada seja estável, as moléculas de fosfolípido têm liberdade no interior da membrana, estando as cadeias hidrocarbonadas em constante movimento devido à rotação sobre as ligações C-C. De facto, os lipossomas são entidades dinâmicas. Contudo, mesmo na fase cristal-líquido a uma temperatura elevada, as cadeias hidrocarbonadas estão longe de apresentarem a liberdade de movimentos que é observada, por exemplo, quando essas mesmas moléculas se encontram dissolvidas em solução orgânica [2]. Os movimentos moleculares das moléculas lipídicas são variados e podem ser movimentos de rotação em torno do seu eixo, movimentação segmentar das caudas, movimentos de “flip-flop” (em que há troca de moléculas entre os dois folhetos), difusão lateral e trocas intervesiculares de fosfolípidos (Figura 1.7) [8].

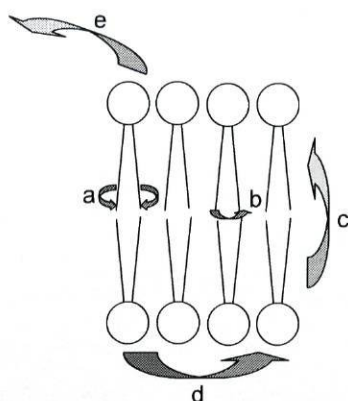


Figura 1.7: Representação esquemática dos movimentos dos fosfolípidos na membrana: a) movimento de rotação; b) movimentação segmentar; c) movimento de “flip-flop”; d) difusão lateral; e e) troca intervesicular.

Uma outra característica importante e inerente à estrutura membranar é a sua permeabilidade, a qual é extremamente dependente da dinâmica e da fase termodinâmica das membranas [1]. O grau de difusão de moléculas e iões através da bicamada varia consideravelmente. As bicamadas são permeáveis a moléculas suficientemente hidrofóbicas, capazes de entrar e permanecer na região apolar, mas podem constituir uma barreira para moléculas mais hidrofílicas. Assim, compostos que sejam mais hidrofílicos podem passar a membrana, mas de uma forma mais lenta ou, então, através de canais característicos existentes na membrana. A água e os iões, como os iões cálcio, potássio, sódio e cloro, por exemplo, passam a membrana através de canais (proteínas; as proteínas que controlam o fluxo de água denominam-

se de aquoporinas), os quais controlam a entrada e saída da célula desses compostos.

A estrutura membranar parece ser importante não só para as características de permeabilidade e interação de moléculas exógenas, como também para a acção de moléculas endógenas acopladas à membrana (como proteínas, receptores e canais) e nos mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos farmacológicos exibidos por uma variedade de fármacos, sendo uma questão fundamental em farmacologia molecular.

1.1.2. Classificação dos lipossomas

Durante muito tempo, a classificação estrutural dos vários tipos de lipossomas esteve rodeada de uma grande falta de uniformização e coerência, o que originou alguma confusão na literatura desta área. Devido, em parte, à falta de uma correcta caracterização das diversas estruturas, o tipo de lipossoma era indicado pelo seu processo de preparação (por exemplo, sonificação, congelação e descongelação, evaporação em fase reversa, extrusão), pelo nome do investigador que caracterizou pela primeira vez o seu processo de preparação (por exemplo, "Banghamossomas", "Huangomossomas") ou simplesmente omitido [3].

A partir do início da década de 80, foi definitivamente adoptada uma nomenclatura para os lipossomas baseada no seu número de bicamadas lipídicas (lamelas) e tamanho. Assim, sem qualquer processamento adicional, a dispersão de fosfolípidos em água origina uma população polidispersa denominada vesículas multilamelares (MLVs - "multilamellar vesicles"), cujos tamanhos estão, geralmente, compreendidos entre 0,4 e 3,5 μm de diâmetro. Cada vesícula consiste em várias bicamadas lipídicas (à volta de cinco ou mais) dispostas concetricamente, entre as quais se dispõe uma fracção do meio aquoso interno. Os MLVs foram os usados nos primeiros estudos e são, então, os de preparação mais imediata. Os lipossomas formados por uma única bicamada são denominados vesículas unilamelares grandes (LUVs - "large unilamellar vesicles") se o seu tamanho for superior a 50 nm segundo alguns autores [5] e a 100 nm segundo outros [3]. As vesículas unilamelares pequenas (SUVs - "small unilamellar vesicles") são caracterizadas por diâmetros aproximados de 25 a 50 nm e as vesículas unilamelares de tamanho intermédio (IUVs - "intermediate-sized unilamellar vesicles") por tamanhos intermédios [2]. Para além destas vesículas unilamelares, devem-se ainda considerar as vesículas unilamelares gigantes (GUVs -

“giant unilamellar vesicles”), com dimensões superiores a 1 μm , podendo chegar às dezenas de μm , tamanho comparável ao de uma célula eucariota (entre 10 a 100 μm de diâmetro [11]). Existem ainda outros tipos de lipossomas, nomeadamente os lipossomas multivesiculares (MVLs - “multivesicular vesicles”) e as vesículas oligolamelares (OLVs - “oligolamellar vesicles”), que, à semelhança das vesículas unilamelares, podem ser subdivididas em pequenas, grandes e gigantes (SOV, LOV e GOV) [1]. Na Figura 1.8 estão representados os vários tipos de lipossomas descritos.

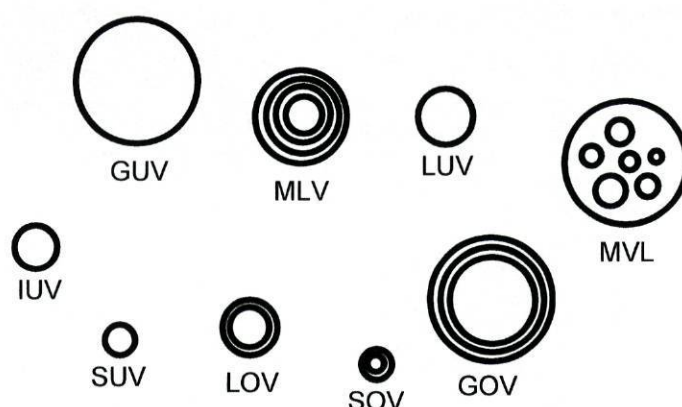


Figura 1.8: Representação esquemática dos vários tipos de lipossomas classificados de acordo com o tamanho e número de bicamadas lipídicas. Cada linha representada uma bicamada lipídica.

Para além do tamanho e número de lamelas, um outro factor essencial para a caracterização de um lipossoma prende-se com a constituição das bicamadas lipídicas. A composição fosfolipídica, a presença de esteróis, a proporção destes componentes e a inserção de outras moléculas nas bicamadas, como proteínas, vão condicionar vários parâmetros da membrana e do próprio lipossoma, nomeadamente a sua carga, estabilidade, curvatura da(s) bicamada(s), fase da membrana e formação de domínios lipídicos [3].

1.1.3. Selecção e preparação dos lipossomas

As moléculas lipídicas em solução aquosa tendem a agregar-se espontaneamente, formando várias estruturas de forma a minimizar a energia livre do

sistema ou função de Gibbs (ΔG). Assim, as moléculas anfipáticas organizam-se em agregados para proteger as cadeias hidrofóbicas da exposição à água. Por cada grupo $-\text{CH}_2-$ e $-\text{CH}_3$ transferido da água para a fase apolar, ocorre uma libertação de energia aproximadamente igual a 700 e 2100 cal.mol^{-1} , respectivamente. Adicionalmente, a energia livre do sistema é diminuída pelas forças de atracção (hidrofóbicas e de Van der Waals) entre as cadeias hidrocarbonadas. Simultaneamente, a hidratação dos grupos polares também reduz consideravelmente a ΔG , sendo esta contribuição ainda maior se os grupos polares fosfolipídicos forem carregados [1].

As forças intra-membranares consistem em forças hidrofóbicas, de Van der Waals, de hidratação e electrostáticas entre as cadeias hidrocarbonadas, sendo as duas primeiras forças de atracção e as duas últimas forças de repulsão. Estas forças intra-membranares são as responsáveis pela organização das moléculas anfipáticas em estruturas vesiculares [1]. As mesmas forças que são responsáveis pela formação de agregados ditam, também, as interacções entre os agregados.

A variação considerável da função de Gibbs quando uma molécula anfifílica passa de um meio aquoso para um meio hidrofóbico explica a tendência dos lípidos para se organizarem na forma de bicamada, de modo a excluir a água do ambiente formado pelas cadeias hidrocarbonadas. A concentração de monómeros na solução aquosa é extremamente baixa, por exemplo, para a DPPC é aproximadamente igual a 2×10^{-11} M, sendo essa concentração cada vez menor à medida que aumenta o comprimento da cadeia hidrocarbonada [5]. Assim, na solução aquosa os fosfolípidos orientam-se maximizando a superfície de exposição dos seus grupos polares ao meio aquoso e com as cadeias hidrocarbonadas agrupadas umas ao lado das outras, evitando a existência de interfaces entre as suas partes hidrófobas e a água. A hidratação do filme lipídico origina a formação de bicamadas lipídicas, organizadas em estruturas tubulares que se alongam, podendo atingir cerca de 100 μm de comprimento, como esquematizado na Figura 1.9. Durante esta fase, as bicamadas estabilizam a uma distância de equilíbrio resultante do compromisso entre as forças repulsivas e atractivas. A agitação do sistema provoca o destacamento das estruturas tubulares, que imediatamente se fecham e originam lipossomas [1].

As vesículas formadas não são necessariamente esféricas, apresentando por vezes formas ovais ou cilíndricas, devido ao mecanismo da sua formação. Ao longo do tempo, estas estruturas vão sendo progressivamente transformadas em estruturas esféricas, em que a energia de curvatura é mínima e o volume aprisionado máximo. Isto acontece, provavelmente, devido a um movimento de "flip-flop" direccionado das

moléculas fosfolipídicas, uma vez que o número inicial no folheto externo deverá ser superior ao do folheto interno. Os lipossomas também podem romper subitamente, originando vesículas filhas, e fechando-se posteriormente numa forma mais estável [1].

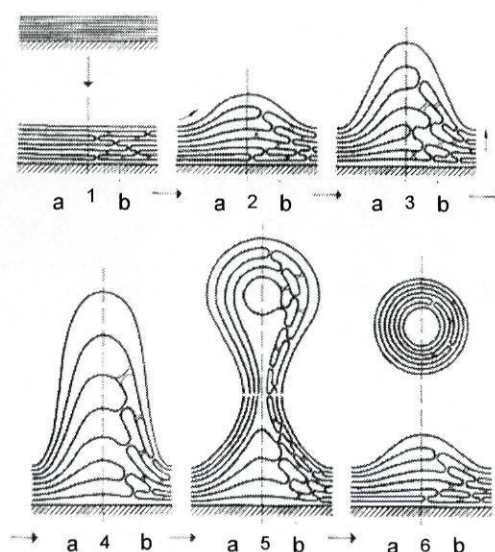


Figura 1.9: Representação esquemática da formação de MLVs pela hidratação do filme lipídico. As linhas representam bicamadas fosfolipídicas. Na parte direita (b) é possível observar um aumento de tamanho pela junção de bicamadas adjacentes. As setas em 2a e 3b mostram a direcção preferencial de migração das moléculas lipídicas. (Adaptado de [1]).

Diversos parâmetros influenciam o processo de formação dos lipossomas, como a relação lípido/água, a temperatura, a agitação do sistema, a composição lipídica, o pH, a força iónica e a osmolaridade da fase aquosa [1].

A ampla utilização de lipossomas para os mais diversos fins criou a necessidade de desenvolver métodos preparativos eficientes, reprodutíveis e com a maior simplicidade possível. Os métodos de preparação de lipossomas, actualmente disponíveis, são diversos e podem apresentar numerosas variantes. Visa-se, fundamentalmente, incrementar a encapsulação dos princípios activos nos lipossomas, conferir uniformidade às vesículas quanto às suas características e optimizá-las no que respeita à sua utilização na terapêutica. Além disso, procura-se que os métodos de preparação possibilitem a obtenção de lipossomas a uma escala industrial.

O tipo de lipossoma é, essencialmente, condicionado pelo seu método de preparação. Assim, visto a composição química, número de bicamadas lipídicas,

distribuição de tamanhos e o volume encapsulado influenciarem, consideravelmente, qualquer aplicação dos lipossomas, o seu método de preparação deverá ser sempre escolhido criteriosamente. De facto, de acordo com os objectivos do estudo, deve ser seleccionado o tipo de lipossoma, normalmente MLVs, LUVs ou SUVs, que serão usados na investigação. Por exemplo, no estudo das propriedades estruturais, dinâmicas e termodinâmicas das membranas, nas quais a sensibilidade pode ser frequentemente um problema, normalmente prefere-se os MLVs, devido à sua maior concentração lipídica, enquanto nos estudos de permeabilidade da membrana e das funções das proteínas, as estruturas preferidas são as unilamelares, especialmente os LUVs. Os SUVs, devido à elevada curvatura que apresentam, possuem anormalidades no empacotamento dos lípidos que os tornam muito susceptíveis à degradação na presença de moléculas biológicas [12]. Adicionalmente, os LUVs apresentam uma fracção de volume encapsulado muito maior do que o dos SUVs, para uma mesma concentração lipídica. Com efeito, o volume retido aquando da formação das vesículas aumenta aproximadamente com o raio ao cubo, ou exactamente com $(r - \delta)^3$, onde δ é a espessura da membrana. Nas aplicações como veículos, as estruturas multilamelares são normalmente preferidas no caso de moléculas hidrofóbicas a serem encapsuladas, enquanto que para as hidrofílicas os LUVs são os mais adequados, pois apresentam uma grande relação volume/superfície. Por outro lado, os MLVs fornecem uma libertação do fármaco mais sustentada que os LUVs, pois as suas membranas vão sendo degradadas gradualmente no local de acção. Se pelo contrário, for desejável uma transferência rápida dos fármacos que transportam, os LUVs serão os mais indicados [13]. Certas aplicações requerem tamanhos menores e os SUVs são obviamente a escolha preferida, por exemplo, em estudos de superfície, pois apresentam uma grande relação superfície/volume, enquanto as vesículas unilamelares gigantes são demasiado frágeis para a maioria das aplicações. Contudo, estas vesículas são muito úteis para os estudos de características básicas, como a elasticidade, permeabilidade e a resistência à tracção, de bicamadas específicas, em estudos nos quais a microscopia óptica seja o principal método utilizado. Em adição ao tamanho e número de bicamadas lipídicas, a composição lipídica é também muito importante, pois dita as propriedades mecânicas e de superfície das vesículas e, deste modo, a estabilidade física e química e as características de interacção *in vitro* e *in vivo*. Frequentemente, a composição lipídica ou a sensibilidade do material a ser encapsulado dita o procedimento de preparação ou, pelo menos, exclui aqueles que poderiam danificar os constituintes.

Adicionalmente, o mesmo tipo de lipossomas preparado por diferentes métodos pode ter, devido às diferenças nos procedimentos de preparação, diferentes propriedades, como por exemplo, a capacidade de encapsulação, a permeabilidade da bicamada ou a estabilidade.

O processo clássico de preparação de lipossomas, iniciado por Alec Bangham em 1965, denomina-se método de hidratação do filme lipídico [1]. Neste método, uma fina e homogênea camada lipídica é depositada nas paredes de um balão de vidro por evaporação à secura, em vácuo ou sob corrente de gás inerte, de uma solução do lípido num solvente ou mistura de solventes orgânicos, os quais sejam, simultaneamente, eficientes na dissolução da concentração de lípido pretendida e suficientemente voláteis, como por exemplo, clorofórmio e clorofórmio-metanol. O filme lipídico preparado é posteriormente hidratado com uma solução aquosa. A agitação da mistura conduz à formação espontânea de uma população de vesículas lipossômicas heterogênea no que respeita ao tamanho e número de bicamadas lipídicas. Os lipossomas assim preparados são denominados de lipossomas multilamelares. A Figura 1.10 apresenta os principais passos deste método.

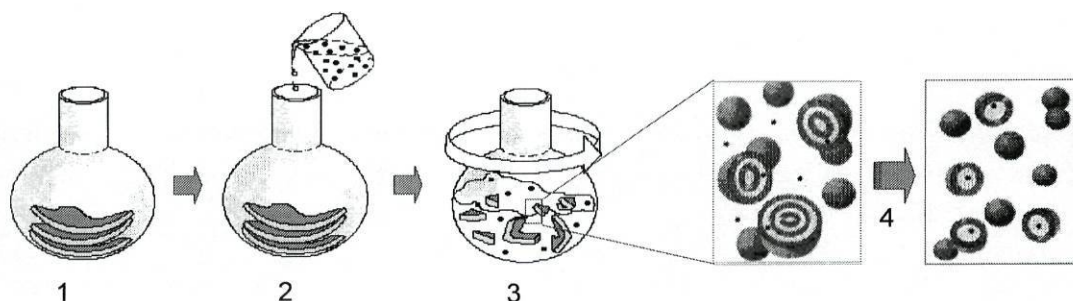


Figura 1.10: Representação esquemática da preparação de MLVs e LUVs: 1) formação do filme lipídico nas paredes do balão, por evaporação à secura do solvente orgânico; 2) adição de uma solução aquosa ao filme lipídico; 3) agitação e obtenção dos MLVs; 4) processamento dos MLVs por extrusão ou sonicação levando à formação de LUVs.

Este processo de preparação pode sofrer algumas variações, nomeadamente quanto ao solvente orgânico utilizado, à possível adição de contas de vidro, à forma de secagem do lípido e aos parâmetros de agitação, como o tempo, a intensidade, o modo e a temperatura de agitação [1]. Contudo, conduzem sempre à formação de vesículas multilamelares muito heterogêneas no que respeita ao tamanho, forma e número de bicamadas lipídicas, com uma pequena percentagem de LUVs e SUVs.

Quando se pretende obter vesículas homogêneas e de tamanho bem definido, torna-se necessário submeter os MLVs a processamentos adicionais. Estes processamentos conduzem à obtenção de lipossomas unilamelares, e incluem métodos mecânicos, químicos ou electrostáticos. Os métodos electrostáticos incluem alteração dos contra-íões, pH ou força iónica e como exemplos de métodos químicos podem ser referidos as técnicas que envolvem a depleção do detergente e a remoção do co-solubilizador. Contudo, os mais frequentemente usados são os métodos mecânicos e destes os mais difundidos são a sonicação e a extrusão, embora existam outros como a microfluidização/homogeneização ou a prensa francesa [1].

A sonicação foi o primeiro tipo de tratamento dado às suspensões lipídicas, sendo, ainda, o mais usado na preparação de lipossomas de reduzidas dimensões e caracteriza-se por transferir uma elevada quantidade de energia para a suspensão lipídica [2]. Este método pode ser efectuado através da utilização de uma ponta de titânio ou em banho de água. A ponta de titânio é empregue em suspensões que necessitem de uma maior energia num pequeno volume, por exemplo, suspensões muito concentradas ou com uma fase aquosa viscosa, enquanto o banho de água para a sonicação é mais adequado para suspensões pouco concentradas e em grande volume [5]. No entanto, como no banho de água ocorre dispersão de energia por uma área maior, não é possível a obtenção de vesículas tão pequenas como as obtidas com a ponta de titânio [2]. O processo de sonicação pode ser prejudicial, principalmente quando se usa a ponta de titânio, a muitos compostos, como os lípidos. Assim, a utilização do banho de água tem a vantagem de não ser tão agressivo, mas requer um tempo mais prolongado de sonicação [5].

A extrusão baseia-se na passagem forçada dos MLVs através de filtros de diâmetro de poro bem definido, sob elevadas pressões (aproximadamente 100 atm) de um gás inerte, a uma temperatura superior à temperatura de transição de fase do ou dos lípidos constituintes da suspensão. Os filtros usados neste processo são membranas de policarbonato ou de celulose com diâmetros de poro entre os 30 nm e vários μm . A repetição da extrusão tende a diminuir o número de bicamadas lipídicas e após aproximadamente 10 extrusões, os lipossomas apresentam-se predominantemente homogêneos e unilamelares. O seu diâmetro final vai depender do tamanho do poro utilizado e das características do próprio lípido, mas, em geral, não se conseguem diâmetros inferiores a 50 ou 60 nm [1].

Para a preparação de vesículas, são também bastante utilizados métodos que não implicam a formação de um filme lipídico, nomeadamente o de injeção de etanol,

o de injeção de éter e o de evaporação em fase reversa. No método de injeção de etanol, uma solução de lípido em etanol é injectada rapidamente numa solução aquosa, através de uma agulha fina. A força da injeção é usualmente suficiente para permitir uma mistura eficiente e, deste modo, o etanol é diluído quase instantaneamente na solução aquosa e as moléculas fosfolipídicas são dispersas uniformemente por todo o meio. Este procedimento origina uma proporção elevada de SUVs com diâmetro aproximadamente igual a 25 nm [5]. No método de injeção de éter, ao contrário do anterior, injecta-se uma solução orgânica imiscível numa solução aquosa. A solução orgânica é também injectada através de uma agulha com um pequeno diâmetro interno, mas a uma temperatura que promova a evaporação do solvente orgânico durante o processo. A lenta evaporação do solvente origina um gradiente éter:água que se estende ao longo de ambos os lados da interface da monocamada lipídica, resultando na formação final de uma bicamada lipídica que se dobra sobre si mesmo para formar uma vesícula fechada [5]. As vantagens dos dois métodos de injeção referidos prendem-se com a simplicidade e a ausência de processamentos físicos, sendo a principal desvantagem a remanescência de vestígios de solvente orgânico na fase aquosa, que terão de ser removidos por diálise ou filtração em gel [1].

No método de evaporação em fase reversa, a fase aquosa é emulsionada na presença de fosfolípidos dissolvidos num solvente volátil e imiscível com a água. A evaporação do solvente, sob vácuo moderado (aproximadamente 450 mmHg), interrompida por agitações fortes para quebrar as estruturas gelificadas, produz lipossomas fundamentalmente do tipo LUV. Este método apresenta como vantagem uma elevada eficácia de encapsulação, a qual, frequentemente, compensa a utilização de outros procedimentos de preparação.

Há ainda métodos que usam já vesículas pré-formadas, principalmente SUVs para formar LUVs, pequenos MLVs, GUVs e especialmente lipossomas com elevada eficiência de encapsulação de moléculas hidrossolúveis. Estes métodos baseiam-se basicamente na fusão, na congelação/descongelação ou na desidratação/re-hidratação dos lipossomas. A fusão pode ser induzida em alguns sistemas pela diminuição da temperatura, preparando as amostras a uma temperatura inferior à temperatura de transição gel-sólido/cristal-líquido ou pela adição de agentes que promovam a fusão, como detergentes, alguns catiões, polímeros e macromoléculas. Por exemplo, SUVs de DPPC podem apresentar um aumento de tamanho de aproximadamente 22 a 70 nm a 20°C abaixo da temperatura de transição gel-

sólido/cristal-líquido ou de 95 nm a aproximadamente 40°C abaixo desse mesmo valor de temperatura [1]. Este método, contudo, não origina bons resultados na presença de lípidos com carga e colesterol [1].

O método que se baseia na execução de ciclos de congelação/descongelação foi originalmente desenvolvido para a preparação de proteolipossomas, ou seja, lipossomas com proteínas membranares nas suas bicamadas. Pode, no entanto, também ser usado para produzir, por exemplo, uma população de MLVs, LUVs ou SUVs de maiores dimensões a partir da rápida congelação e descongelação de SUVs, possivelmente na presença de substâncias a serem encapsuladas ou reconstituídas. Esta técnica permite aumentar a eficácia de encapsulação de fármacos e melhorar as características físicas da membrana lipídica. De facto, da execução dos ciclos de congelação/descongelação resulta uma alteração dramática na morfologia dos lipossomas. As vesículas, que apresentam inicialmente uma estrutura compacta constituída por membranas concêntricas, passam a apresentar, após cinco ciclos de congelação/descongelação, uma nova estrutura com espaços interlamelares aumentados e sistemas lamelares fechados que podem estar intercalados entre as membranas fosfolipídicas. Esta alteração permite o aumento do volume de solução retido no interior da vesícula, bem como o aumento da eficácia de encapsulação e uma maior homogeneidade relativamente à distribuição de solutos [14].

A técnica de desidratação/re-hidratação envolve a liofilização de lipossomas unilamelares ou multilamelares, por exemplo, dispersos num meio aquoso que contem o fármaco a incorporar. Em seguida, re-hidrata-se controladamente, obtendo-se MLVs com elevadas eficácias de incorporação [1].

1.1.4. Estabilidade dos lipossomas

Com o decorrer do tempo, os lipossomas podem sofrer diversos tipos de alterações, nomeadamente físicas, químicas e biológicas. Contudo, se preparados e armazenados sob condições bem específicas, a ocorrência destas alterações pode ser minimizada. Os métodos ideáveis para obviar os problemas da instabilidade dos lipossomas podem ser divididos em duas classes: os que minimizam os processos degenerativos que podem ocorrer e os que ajudam os lipossomas a fazer face a esses processos [2].

Fisicamente, e dependendo da sua constituição, bem como do meio envolvente, os lipossomas podem sofrer agregação, fusão, deposição, ruptura membranar e, no caso de encapsularem solutos, perda do seu conteúdo [1, 2]. A ruptura e fusão das vesículas podem ocorrer como um resultado de imperfeições na membrana introduzidas durante a sua manufactura. Estas irregularidades podem ser dissipadas pela incubação dos lipossomas a uma temperatura mais elevada que a temperatura de transição de fase, para permitir que as diferenças na densidade de empacotamento entre o folheto interno e externo de uma mesma bicamada possam ser equilibrados por movimentos de “flip-flop” transmembranares [2]. Contudo, mesmo após a execução deste processo, a agregação, a fusão e outros processos degenerativos físicos, podem ocorrer numa extensão significativa se os lipossomas forem armazenados durante longos períodos de tempo [2]. A agregação e sedimentação de lipossomas neutros, provocadas essencialmente pelas interacções de Van der Waals e mais pronunciadas nas vesículas com maiores dimensões, constituem um fenómeno natural e inevitável. No entanto, um método simples para reduzir este processo consiste na inclusão de uma quantidade reduzida de fosfolípidos carregados negativamente (por exemplo, 10% de ácido fosfatídico ou fosfatidilglicerol) na constituição lipídica. As vesículas unilamelares de tamanho reduzido (diâmetro inferior a 40 nm) fundem-se com facilidade, de forma a obviar a tensão da curvatura pronunciada apresentada pelas suas membranas. Uma vez que este fenómeno pode ocorrer especialmente à temperatura de transição de fase, é aconselhável armazenar as suspensões dos lipossomas a uma temperatura diferente dessa. Adicionalmente, pode ser vantajoso incluir uma percentagem suficiente de colesterol na membrana para reduzir ou eliminar a transição de fase, particularmente se esta ocorrer num intervalo de temperatura próximo da que os lipossomas são armazenados ou manuseados. Quanto aos lipossomas carregados negativamente, é necessário um cuidado adicional no que respeita à presença de iões metálicos, recorrendo-se com frequência à introdução de um agente quelante ao meio de suspensão [2].

A verificação da estabilidade física das formulações lipossómicas pode efectuar-se através da avaliação do diâmetro médio das vesículas ao longo do tempo, utilizando para tal a espectroscopia de correlação fotónica.

Quimicamente, os fosfolípidos podem sofrer hidrólise e oxidação, os quais constituem os dois processos de degradação mais comuns. Normalmente, os lipossomas não contêm grupos redutíveis e, deste modo, apresentam uma grande estabilidade relativamente à redução, sendo, geralmente, a parte polar dos fosfolípidos

muito mais estável que as cadeias hidrocarbonadas. A oxidação dos fosfolípidos, nas suas cadeias hidrocarbonadas insaturadas, ocorre na ausência de oxidantes específicos por um mecanismo de radicais livres. A reacção em cadeia de oxidação, inicia-se pela remoção de um átomo de hidrogénio da cadeia hidrocarbonada, que pode ocorrer na presença de vestígios de metais de transição, por sonicação ou por exposição a radiação electromagnética. Embora qualquer lípido possa formar radicais por este mecanismo, os mais susceptíveis à degradação são os lípidos contendo ligações duplas, uma vez que a insaturação permite a deslocalização do electrão desemparelhado ao longo da cadeia lipídica e diminui a energia deste estado (e por isso aumenta a probabilidade destes serem formados). Os lípidos polinsaturados são assim especialmente susceptíveis à degradação oxidativa [2].

Na presença de oxigénio, o processo pode desenvolver-se pela formação de hidroperóxidos, os quais se podem decompor espontaneamente e formar aldeídos. Em cadeias hidrocarbonadas contendo múltiplas insaturações, processos adicionais podem ocorrer, tais como a formação de endoperóxidos e novo arranjo das duplas ligações na molécula. Os fosfolípidos naturais contêm apenas duplas ligações não conjugadas (ou seja, não adjacentes) e a remoção de um átomo de hidrogénio de um grupo metileno entre duas ligações duplas estende a insaturação sobre cinco carbonos, resultando na formação de um dieno conjugado que é energeticamente mais favorável do que as duas duplas ligações isoladas. O radical intermediário é estabilizado quer pela adição de oxigénio, quer pela remoção de um átomo de hidrogénio de uma cadeia hidrocarbonada próxima, a qual, uma vez oxidada, pode recomeçar um novo processo de oxidação. Em lípidos com um elevado número de insaturação, este processo pode ter lugar várias vezes numa mesma molécula, dando origem à conjugação de três ou mais ligações duplas (trienos conjugados) [2].

A avaliação da degradação por fenómenos de oxidação pode ser efectuada pela determinação dos seus produtos finais, nomeadamente peróxidos, aldeídos e ligações duplas ou triplas conjugadas, os quais podem ser facilmente detectados por espectrofotometria de ultravioleta/vísivel (UV/Vis) ou mesmo pelo seu cheiro [1]. Os dienos conjugados, por exemplo, podem ser facilmente detectados por espectrofotometria de UV/Vis, uma vez que eles apresentam um pico de absorvância a 230 nm, enquanto que na ausência de ligações conjugadas, os fosfolípidos absorvem a comprimentos de onda na ordem dos 200 a 205 nm. Uma degradação mais acentuada dos fosfolípidos pode ainda ser assinalada pelo aparecimento de um terceiro pico a 270 nm, devido à formação de trienos conjugados [2].

O nível de oxidação dos lipossomas pode ser consideravelmente diminuído se se tiver em conta as seguintes precauções: a) os lipossomas devem ser preparados a partir de fosfolípidos não armazenados durante longos períodos de tempo; b) evitar procedimentos que envolvam temperaturas elevadas; c) conduzir os processos de manufactura na ausência de oxigénio; d) desoxigenar as soluções aquosas com um gás inerte; e) armazenar as suspensões de lipossomas numa atmosfera inerte e no escuro; e f) incluir antioxidantes (por exemplo, vitamina E) como componentes das membranas lipídicas. Pode ainda haver necessidade de acrescentar à formulação um agente quelante de metais (como o ferro), para prevenir a iniciação da reacção em cadeia. Uma abordagem alternativa ao problema da oxidação consiste na redução da percentagem de lípidos oxidáveis na membrana, pelo uso de fosfolípidos saturados em vez de insaturados [2], podendo a fluidez e a permeabilidade serem controladas pelo uso, por exemplo, de pequenas cadeias não polares, de uma pequena percentagem de colesterol ou de moléculas anfipáticas com apenas uma cadeia hidrocarbonada [1].

A hidrólise dos fosfolípidos, ao nível das ligações éster, origina lisofosfolípidos e ácidos gordos livres. Este processo químico degenerativo é fortemente afectado pela temperatura e pelo pH do meio, verificando-se que ocorre em menor extensão a baixas temperaturas e para valores de pH próximos da neutralidade [2]. Numa fase inicial, a hidrólise não afecta a estrutura dos lipossomas, mas altera significativamente outras propriedades, especialmente a permeabilidade da membrana. Contudo, numa fase mais avançada, a integridade dos lipossomas é desestabilizada, uma vez que os ácidos gordos livres e os lisofosfolípidos podem actuar como detergentes e, assim, iniciar a dissolução da membrana que finaliza com a sua desagregação. Adicionalmente, os produtos resultantes das reacções de hidrólise apresentam maior solubilidade em água do que os fosfolípidos seus precursores, promovendo uma aceleração dos processos de degradação posteriores, visto diminuírem o pH do meio.

Seleccionando cuidadosamente o valor de temperatura, de pH e diminuindo o tempo de processamento, faz com que a hidrólise ocorra numa extensão não significativa. No entanto, esta lenta progressão pode condicionar a longo prazo a estabilidade das suspensões dos lipossomas, e, deste modo, recomenda-se que as amostras que necessitem de ser armazenadas por longos períodos de tempo sejam liofilizadas ou pelo menos congeladas [1]. Um método que evita totalmente as reacções de hidrólise consiste no uso de lípidos que contêm ligações éter em vez de éster, como os que são encontrados nas membranas de bactérias halofílicas [2]. A

hidrólise *in vivo* como resultado da acção enzimática pode ser prevenida, por exemplo, pelo uso da esfingomielina [2].

Biologicamente, é necessário ter em consideração que as formulações lipossómicas são geralmente emulsões, cuja fase contínua corresponde à fase aquosa, facilmente sujeita a contaminação microbiológica. Os lipossomas não podem ser esterilizados por exposição a altas temperaturas e também são susceptíveis a diversos tipos de radiação, assim como a agentes químicos esterilizantes, e, deste modo, o único método possível para esterilizar após manuseamento é a filtração. Evidentemente, este procedimento apenas é aplicável a lipossomas de tamanho suficientemente pequeno que permita facilmente a passagem através de uma membrana com poros de $0,22\ \mu\text{M}$ de diâmetro [2]. Assim, este processo não pode ser aplicado a lipossomas de maiores dimensões, tendo, então, a sua manipulação sob condições assépticas uma maior importância. Adicionalmente, a solução orgânica inicial lipídica deve passar através de uma membrana filtrante de celulose regenerada (diâmetro de poro igual a $0,45\ \mu\text{M}$) e fibra de vidro antes de se proceder à evaporação do ou dos solventes orgânicos, para remover, por exemplo, esporos e microorganismos [2]. Além do referido, o armazenamento também deve ser feito a temperaturas reduzidas.

1.1.5. Métodos de caracterização dos lipossomas

As características físicas e químicas dos lipossomas, tais como o tamanho e sua homogeneidade, número de bicamadas, permeabilidade, estabilidade e eficiência de encapsulação são dependentes do método utilizado na sua preparação, pelo que é importante proceder à sua caracterização. Existem diversos métodos para a análise dos lipossomas, os quais podem ser agrupados nas seguintes categorias: microscópicos, espectroscópicos, de difracção e correlação fotónica, termodinâmicos, hidrodinâmicos, mecânicos, químicos e computacionais, entre outros, também como biológicos, nos quais os testes *in vitro* e *in vivo* mostram a reactividade, interactividade, segurança ou toxicidade, e respostas biológicas a vários lipossomas e ao conteúdo que transportam [1]. Em seguida é feita uma breve descrição de alguns destes métodos.

Microscópicos: Os métodos microscópicos permitem a investigação visual directa dos lipossomas. Contudo, deve-se ter conhecimento que há várias

possibilidades de se observar artefactos que podem surgir devido à preparação das amostras. Quanto à microscopia óptica, as técnicas usualmente mais usadas são a microscopia de campo brilhante e a microscopia de contraste de fase. Estas técnicas com uma resolução inferior a $0,3\ \mu\text{m}$, permitem o estudo de LUVs, MLVs e especialmente de GUVs. A observação óptica directa revela informações sobre tamanho, homogeneidade da amostra e o número de bicamadas das vesículas [1].

A microscopia electrónica constitui indubitavelmente o método mais preciso, uma vez que permite visualizar cada lipossoma individualmente e apresenta perícia para anular numerosos artefactos, possibilitando, por si só, a obtenção de informação exacta acerca do aspecto de uma população lipossómica para todo o intervalo de tamanhos [2]. No entanto, este método requer uma preparação complicada das amostras, pois são analisadas sob vácuo e têm que apresentar condutividade eléctrica [1]. A introdução da criomicroscopia permitiu a observação directa de lipossomas na sua forma hidratada [1].

Espectroscópicos: Praticamente todas as técnicas espectroscópicas são utilizadas na análise dos lipossomas. A espectrofotometria é um método simples que permite, em muitos casos, o acompanhamento dos processos de encapsulação de diversas substâncias pelas vesículas. É também usada nas medidas de turvação, a qual pode fornecer, após elaboração de curvas de calibração, uma estimativa qualitativa do tamanho e da concentração dos lipossomas, uma vez que a turbidez está relacionada com a dispersão de Rayleigh, isto é, a intensidade da luz dispersa é proporcional a λ^{-4} , onde λ é o comprimento de onda [1]. A espectroscopia de infravermelho e a de Raman são usadas no estudo da estrutura e dinâmica das cadeias hidrocarbonadas [1]. As técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) e de ressonância paramagnética electrónica (EPR) são rotineiramente usadas na análise de sistemas membranares, fornecendo informações acerca da conformação, ordem das cadeias hidrocarbonadas e da zona polar da bicamada, temperatura de transição de fase e constantes de difusão no interior da membrana, bem como do tamanho, número de bicamadas, permeabilidade da membrana e proporção de movimentos de “flip-flop” [1].

Métodos de difracção e de correlação fotónica: Os métodos de difracção e correlação fotónica permitem a obtenção de informações acerca da estrutura e tamanho dos lipossomas. Os mais usados são os de espectroscopia de correlação fotónica (“dynamic light scattering” ou “quasielastic laser light scattering”), os quais fornecem dados relativos ao diâmetro dos lipossomas, a partir de medidas da difusão

destes em suspensão. Os métodos de difracção de raios-X e de difracção de neutrões possibilitam informações sobre a espessura da membrana e das camadas de água nos MLVs [1].

Métodos termodinâmicos: Os métodos termodinâmicos incluem os métodos de calorimetria. A calorimetria diferencial de varrimento (DSC) é o método mais útil para estudar a energia das transições de fase [1].

Métodos hidrodinâmicos: Os métodos hidrodinâmicos para a caracterização das vesículas, por exemplo, baseiam-se na determinação da viscosidade, na determinação do potencial-zeta e na centrifugação [1]. O último método referido fornece dados semelhantes aos obtidos por espectroscopia de correlação fotónica, enquanto que o potencial-zeta informa acerca do potencial de membrana das vesículas [1].

Outras análises: A determinação qualitativa de contaminação, como por diferentes lípidos, pode ser obtida por cromatografia, como por exemplo, HPLC [1].

Uma outra análise requerida frequentemente inclui a determinação da permeabilidade da membrana, o volume encapsulado e a eficiência de encapsulação. A permeabilidade da membrana pode ser determinada, por exemplo, pela actividade enzimática e pela determinação da concentração por métodos analíticos ou electroquímicos clássicos. Muitos destes métodos requerem a separação dos lipossomas das moléculas não encapsuladas, o que pode ser realizado através de cromatografia em coluna [1].

A eficiência de encapsulação pode ser determinada por métodos idênticos. Se a substância a determinar se encontrar encapsulada não é possível a determinação da sua concentração por métodos espectroscópicos, fluorescentes ou electroquímicos. Em consequência da lise dos lipossomas com uma pequena quantidade de detergente, como o Triton X-100, todas as moléculas são libertadas e a eficiência de encapsulação corresponde simplesmente à razão de duas leituras [1]. Além disso, a diálise, centrifugação, cromatografia em gel ou simples filtração são as mais frequentemente usadas.

As interacções dos lipossomas com o meio biológico são caracterizadas e acompanhadas por vários ensaios *in vitro* e *in vivo*. A farmacocinética e biodistribuição são, normalmente, estudadas através da marcação dos lipossomas com diversas substâncias, hidrofílicas ou hidrofóbicas, radioactivas, fluorescentes ou colorimétricas, as quais podem ser usadas em diferentes modelos animais [1].

Além da caracterização físico-química e estrutural dos lipossomas, há também muitos métodos para analisar as características biológicas dos lipossomas. A sua estabilidade nos fluidos biológicos pode ser verificada por ensaios de perda do conteúdo no plasma ou em outro fluido do corpo. Além de numerosos ensaios *in vitro*, incluindo a interacção com vários tipos de células na presença de diferentes agentes, muitos estudos são realizados em diferentes modelos animais *in vivo*. Estes incluem, por exemplo, o estudo da toxicidade, da dose máxima tolerável e a eficácia em relação a diferentes doenças. As formulações injectáveis também têm que ser testadas relativamente à pirogenicidade e esterilidade [1].

Na Tabela 1.1 são apresentados os diferentes métodos para a caracterização dos lipossomas, descritos anteriormente de uma forma sucinta.

1.1.6. Doseamento dos fosfolípidos

Os métodos frequentemente utilizados para a quantificação de fosfolípidos são métodos indirectos, nos quais se procede ao doseamento do fosfato contido nas amostras. De facto, a determinação quantitativa dos fosfolípidos é difícil de realizar directamente, uma vez que os lípidos “secos” podem conter uma considerável quantidade de solvente residual ou, no caso de se serem derivados de lipossomas, outros lípidos [2].

Método de Bartlett: O método de Bartlett baseia-se na mineralização ácida (ácido perclórico a 70% ou ácido sulfúrico 5 M) do fósforo fosfolipídico a fosfato inorgânico. O fosfato é depois convertido em ácido fosfomolibdico por adição de uma solução de molibdato de amónio e, finalmente, reduzido quantitativamente a azul de molibdénio por adição do reagente de Fiske & Subbarrow (ácido 1-amino 2-naftil 4-sulfónico). A intensidade da cor azul das soluções é medida espectrofotometricamente e a concentração do fósforo, e, consequentemente, a concentração de fosfolípido é determinada por interpolação numa recta de calibração obtida com soluções padrão de fósforo. A maioria dos fosfolípidos contem exactamente um mole de fósforo por mole de fosfolípido, de modo que a concentração dos fosfolípidos é obtida directamente a partir da quantidade de fósforo presente na amostra. Contudo, a cardiolipina constitui uma excepção a este princípio, uma vez que contem duas moles de fósforo por mole de fosfolípido e, deste modo, se a amostra contiver este lípido é necessário fazer um ajuste apropriado nos cálculos [2].

Tabela 1.1: Diferentes métodos para a caracterização dos lipossomas (adaptado de [1]).

Propriedade	Métodos
Tamanho e sua distribuição	Microscopia electrónica, espectroscopia de correlação fotónica, cromatografia, (RMN, EPR)
Número de bicamadas lipídicas	Microscopia electrónica, RMN
Fase termodinâmica	DSC, RMN, EPR, fluorescência, raio-X
Estrutura	RMN, espectroscopia de infravermelho, espectroscopia de Raman
Dinâmica	RMN, EPR, fluorescência
Eficiência de encapsulação	Cromatografia, diálise, centrifugação
Permeabilidade	Fluorescência
Propriedades mecânicas	Microscopia óptica
Propriedades de superfície	RMN, potencial-zeta
Estabilidade física	Perda de conteúdo no plasma, perda de conteúdo em outros fluídos biológicos
Agregação	Turbidez, microscopia electrónica, microscopia óptica
Fusão	Fluorescência, cromatografia, microscopia electrónica
Estabilidade química	HPLC, cromatografia, colorimetria
Esterilidade	Examinação do filtrado, crescimento das colónias
Teste de pirogenecidade	Teste da temperatura do coelho
Segurança	Dose máxima de tolerância em várias espécies
Toxicidade	Dose letal para 50% da população de várias espécies
Farmacocinética	Semi-vida de vários marcadores no sangue e tecidos
Biodistribuição	Circulação/tempo de retenção em ratinhos, ratos, cães e outros modelos animais
Actividade das moléculas encapsuladas	Todos os métodos de análise química, física e biológica
Eficácia dos fármacos	Diferentes modelos animais e culturas celulares

Abreviaturas: RMN: ressonância magnética nuclear; EPR: ressonância paramagnética electrónica; HPLC: cromatografia líquida de alta pressão, DSC: calorimetria diferencial de varrimento.

O método de Bartlett é um método muito sensível, permitindo a determinação de concentrações de fosfato inferiores a 30 nmol.mL^{-1} , mas pode apresentar alguma irreprodutibilidade. Um dos problemas prende-se com o facto de que este teste é facilmente perturbado por contaminação de uma quantidade mínima de fosfato inorgânico. Uma precaução consiste na condução do ensaio usando uma série de tubos de vidro borosilicatos bem lavados e que não tenham sido usados com outro objectivo. Deve-se usar sempre água bidestilada para fazer todas as soluções. Outra origem de erro é a fase de digestão, onde um excessivo borbulhar pode resultar em dispersão ou perda do material no interior do tubo, e, adicionalmente, uma quantidade não especificada do solvente aquoso pode evaporar, alterando o volume final (e concentrações) quando a determinação da absorvância final for feita. Para minimizar os erros introduzidos por estes factores, a temperatura usada na mineralização do fósforo inorgânico deve ser rigorosamente controlada, de modo a não ultrapassar os 200°C , mas não ser inferior a 180°C para assegurar uma digestão apropriada [2].

Todas as amostras devem ser avaliadas pelo menos em triplicado, usando três alíquotas retiradas individualmente de uma determinada amostra. Os lípidos, especialmente aqueles em solução orgânica, devem ser medidos por microcapilares de vidro calibrados.

A sensibilidade do método de Bartlett ao fosfato inorgânico cria um problema na medida dos lipossomas fosfolipídicos suspensos em tampões fisiológicos, os quais usualmente contêm iões fosfato. Um modo para ultrapassar este problema é o emprego de um método mais específico que não seja afectado pelo fosfato inorgânico [2].

Método de Stewart: O método de Stewart baseia-se na capacidade dos fosfolípidos formarem complexos com o tiocianoferrato de amónio em soluções orgânicas. A utilização de um factor de conversão permite a transformação dos valores de absorvância em miligramas de fosfolípido. Visto que o factor de conversão difere de acordo com os diferentes grupos polares presentes nos fosfolípidos, este método não pode ser aplicado a amostras contendo misturas de fosfolípidos cujas proporções são desconhecidas. Este método é insensível ao fosfatidilglicerol. Contudo, uma vantagem do método de Stewart, contrariamente ao método de Bartlett, é que a presença de fosfato inorgânico não interfere com o ensaio [2].

Outros métodos: Outros métodos para a determinação quantitativa de fosfolípidos incluem o método colorimétrico enzimático, que consiste numa série de reacções enzimáticas sucessivas que transformam, de um modo quantitativo, a

fosfatidilcolina em 4-(p-benzo-quinona-monoimino)fenazona, que apresenta coloração violácea, cuja intensidade é proporcional à quantidade de fosfatidilcolina presente. Existe ainda o ensaio de complexação da rodamina, o qual, contudo, parece ser muito susceptível a interferências. Em casos onde a determinação de diferentes fosfolípidos numa mistura é requerida, pode ser adoptada uma modificação ao método de Bartlett, na qual os lípidos são primeiramente separados por cromatografia [2].

1.1.7. Aplicação dos lipossomas

As principais áreas científicas de aplicação dos lipossomas encontram-se sumariadas na Tabela 1.2.

Tabela 1.2: Principais áreas científicas de aplicação dos lipossomas (adaptado de [1]).

Área científica	Aplicação
Matemática	Topologia de superfícies bidimensionais no espaço tridimensional
Física	Comportamento de agregação, tamanho, variação de tamanho e forças mecânicas dos materiais
Biofísica	Permeabilidade e transição de fase em duas dimensões
Química-física	Comportamento coloidal de sistemas com características físicas bem definidas
Química	Catálise, compartimentação de reacções
Bioquímica	Reconstituição de proteínas membranares em membranas artificiais
Biologia	Modelos membranares
Farmacêutica	Estudos das funções celulares, mecanismo de acção dos fármacos
Medicina	Transporte e libertação de fármacos

1.1.7.1. Lipossomas como modelos membranares

A utilização de lipossomas como modelos membranares advém do facto de poderem ser preparados a partir de constituintes naturais e de apresentarem uma

estrutura idêntica à porção lipídica das biomembranas, de acordo com o modelo proposto, em 1972, por Singer e Nicholson e denominado o modelo de mosaico fluido [2, 11]. Este modelo descreve a membrana celular, representada na Figura 1.11, como uma bicamada lipídica incrustada de proteínas e glicoproteínas, integradas ou periféricas, que estão intimamente relacionadas com as funções específicas da membrana [5]. O modelo de mosaico fluido para as bicamadas lipídicas tem sido largamente aceite, tendo a sua validade sido demonstrada experimentalmente [11]. Adicionalmente, a distribuição dos lípidos entre os dois folhetos membranares foi estabelecido através de estudos realizados com fosfolípases. As fosfolípases não conseguem atravessar a membrana e, deste modo, apenas os fosfolípidos presentes na superfície externa de células intactas são susceptíveis à sua acção. Tais estudos demonstraram que os lípidos nas biomembranas, assim como as proteínas, estão distribuídos assimetricamente entre os folhetos interno e externo da bicamada lipídica [11]. Contudo, os lípidos e as proteínas também podem estar organizados em cada folheto da membrana plasmática. Deste modo, as biomembranas apresentam dois ou mais domínios distintos, os quais têm diferentes funções. De facto, os domínios da membrana apresentam diferentes composições em lípidos e proteínas, e podem controlar processos membranares fisiologicamente importantes [1, 11].

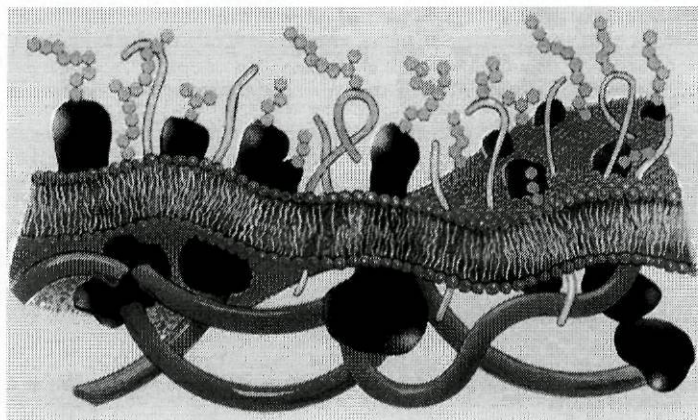


Figura 1.11: Representação esquemática da membrana celular segundo o modelo de mosaico fluido (adaptado de [1]).

A similaridade entre lipossomas e membranas naturais pode, então, ser aumentada pela inclusão de proteínas, formando um ambiente que mimetiza o natural, mas cuja composição pode ser controlada, de forma a determinar o papel de cada

componente em determinado fenómeno em estudo. Com efeito, os estudos de estrutura, dinâmica e permeabilidade dos lipossomas em função de diferentes parâmetros, como a composição lipídica, temperatura, força iónica, presença de vários iões, proteínas e enzimas, têm revelado muitos detalhes sobre a funcionalidade das biomembranas. Adicionalmente, a utilização destes agregados simples para simular sistemas muito mais complexos permite o estudo de mecanismos fundamentais para os processos biológicos, como a absorção e o transporte de moléculas exógenas, reconhecimento molecular, funcionamento de enzimas e fenómenos relacionados com o modo de acção dos fármacos [1, 2].

A interacção de diversos fármacos com a membrana lipídica constitui fundamental importância para a sua actividade farmacológica, como é o caso dos anestésicos locais [15, 16], antibióticos [17-19], β -bloqueadores [20], fármacos anticancerígenos [21-23], anti-inflamatórios [19, 24-28], entre outros. Nestes casos, é importante quer a localização e orientação apropriada dos fármacos na membrana, para que ocorra interacção com os locais activos dos receptores membranares, quer a extensão da ligação do fármaco à membrana lipídica, fenómeno quantificado pelo coeficiente de partição [29]. É na dificuldade da execução destes estudos *in vivo* ou em culturas celulares que reside parte da importância da utilização dos lipossomas como modelos das membranas celulares.

1.1.7.2. Lipossomas como meio reaccional

A capacidade dos lipossomas solubilizarem moléculas, compartimentarem reagentes de solubilidades diferentes em microambientes distintos e de funcionarem como catalisadores de inúmeras reacções químicas, faz destas estruturas uma interessante alternativa aos meios reaccionais habitualmente utilizados em técnicas analíticas. Possuem, ainda, capacidade para estabilizar e proteger moléculas fotossensíveis, bem como para favorecer processos fotoquímicos e fotofísicos [1].

A utilização de lipossomas em técnicas analíticas requer o conhecimento aprofundado do tipo e extensão da interacção de um determinado soluto com as vesículas, bem como o discernimento das consequências dessa interacção a nível das propriedades físico-químicas do soluto e da vesícula.

1.1.7.3. Lipossomas como transportadores de fármacos

A capacidade dos lipossomas para dissolver, proteger e conduzir fármacos hidrossolúveis ou lipossolúveis, assim como a sua biocompatibilidade com as membranas celulares e a possibilidade de adicionar determinados ligandos à sua superfície para que atinjam um determinado tipo de células, constituem as principais razões para a sua aplicação como sistemas transportadores de fármacos em farmacologia e medicina [1, 5]. Assim, os lipossomas podem ser utilizados na terapia de várias doenças (como por exemplo, doenças cancerígenas, infecções, inflamação, na intoxicação através de agentes quelantes capazes de remover os metais acumulados nos tecidos), como na profilaxia (vacinas, pela aplicação de lipossomas como adjuvantes imunológicos dos antígenos) e como meios auxiliares de diagnóstico (visualização de metástases através da incorporação de materiais de contraste e de isótopos radioactivos) [1, 5, 6].

A administração de um fármaco em sistemas transportadores influencia os seus parâmetros, em especial os relativos à farmacocinética, farmacodinâmica e biodistribuição, os quais, por sua vez, afectam o seu índice terapêutico (razão entre a eficácia do fármaco e os seus efeitos secundários indesejáveis). De facto, os sistemas transportadores podem aumentar a biodisponibilidade dos fármacos e diminuir os seus efeitos tóxicos, o que origina um incremento do índice terapêutico. Podem ainda veicular e libertar os fármacos numa célula-alvo, diminuindo assim a dose necessária para se observar determinada acção e diminuindo ao máximo os efeitos secundários [1].

Uma das principais vantagens da utilização de lipossomas como transportadores é a facilidade de incorporação de um fármaco, independentemente da sua carga ou massa molecular, podendo mesmo acomodar substâncias com características de polaridade muito diferentes no mesmo sistema. Como formulação farmacêutica, as principais vantagens conferidas pela encapsulação de fármacos em lipossomas são o aumento da solubilização de fármacos lipossolúveis e a protecção conferida por estes sistemas à hidrólise dos fármacos, provocada, por exemplo, pela acção de enzimas degenerativas, de condições de pH adversas e de acção da luz [1]. Para além disso, os sistemas de vesículas lipídicas encontram-se já bem caracterizados em termos físico-químicos, estrutura, estabilidade, toxicidade (sendo preparados a partir de substâncias naturais são relativamente não tóxicos e biodegradáveis), imunogenicidade e formas de administração *in vivo* (intravenosa,

intramuscular, subcutânea, dérmica, ocular, pulmonar, nasal ou oral), dispondo-se de um vasto leque de possibilidades na escolha do sistema mais adequado para cada fim. Contudo, embora os resultados obtidos *in vitro* sejam encorajadores, a aplicação de lipossomas *in vivo* está limitada pela sua retenção ao nível do sistema retículo-endotelial (SRE) [3]. Com efeito, os lipossomas na corrente sanguínea são rapidamente capturados pelos macrófagos, assim como pelo fígado, baço, nódulos linfáticos, pulmões e medula óssea, os quais têm como função o processamento dos agentes estranhos que entram no organismo. Deste modo, o tempo de semi-vida plasmática dos lipossomas pode ser reduzido a poucos minutos [2]. A captura dos lipossomas pelo SRE pode ainda ser responsável por alguns dos seus efeitos adversos, nomeadamente pela potencial toxicidade que pode apresentar relativamente a esse mesmo sistema, especialmente quando os lipossomas transportam fármacos ou pelo aumento da susceptibilidade a várias infecções no caso do SRE se encontrar saturado [1]. Deve-se ainda referir que, além destes efeitos, os lipossomas podem ainda apresentar outros efeitos adversos, como serem simplesmente muito grandes e poderem obstruir capilares, principalmente os pulmonares, provocando embolismo pulmonar ou pela alteração ou influência das funções das lipoproteínas devido à troca de lípidos (por exemplo, o aumento da razão colesterol:lípido na membrana dos eritrócitos diminui a actividade da enzima $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$) [1].

Apesar das limitações referidas para a utilização de lipossomas como sistemas transportadores de fármacos, a utilização de vesículas lipídicas continua a ter grandes vantagens relativamente a outras famílias de transportadores. Os problemas existentes levaram ao desenvolvimento de sistemas lipídicos modificados, essencialmente pela inserção de determinadas moléculas na sua camada exterior, com novas possibilidades de transporte direccionado para um determinado alvo e com o objectivo de evitar a sua eliminação pelo SRE. Com efeito, as características físicas e composição dos lipossomas afectam a sua captura pelo SRE, como por exemplo, o tamanho e a fluidez. Assim, os lipossomas de maiores dimensões são capturados mais rapidamente, bem como os que, devido à sua constituição, são mais rígidos. Os métodos de modificação experimentados na alteração dos lipossomas de modo a reduzir a sua eliminação incluíram a sua associação com anticorpos específicos para determinadas células, revestimento com imunoglobinas M (IgM) agregadas por aquecimento, ligação covalente de anticorpos, incorporação de esfingomiélin e colesterol ou por incorporação de lípidos imunogénicos, glicoproteínas e glicolípidos naturais ou sintéticos [1-3, 5]. Os lipossomas assim modificados foram genericamente

designados de lipossomas furtivos ("stealth liposomes") e podem apresentar um tempo de semi-vida 100 vezes superior [1, 3].

O sucesso do transporte de um determinado fármaco pelos lipossomas depende não só da eficiência com que o lipossoma o veicula até ao local alvo, mas também da forma como a célula interacciona com o lipossoma e recebe o seu conteúdo. Um lipossoma pode interaccionar com uma célula de cinco maneiras, esquematizadas na Figura 1.12 [1, 2, 5]:

- a) transferência intermembranar: transferência dos componentes lipídicos, como fosfolípidos (fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina) e colesterol, entre duas bicamadas fosfolipídicas em contacto próximo, sem necessidade de ruptura do lipossoma ou prejuízo da integridade membranar. Com efeito, é possível ocorrer a transferência referida (frequentemente nas duas direcções) sem perda do conteúdo do compartimento aquoso dos lipossomas;
- b) libertação por contacto: o contacto com a célula aumenta a permeabilidade da membrana do lipossoma, o que leva à libertação dos solutos hidrossolúveis, que podem assim ser absorvidos pela célula;
- c) adsorção: pode ser resultado de forças físicas atractivas ou da ligação de moléculas da membrana do lipossoma a receptores específicos. A adsorção constitui um pré-requisito essencial para que ocorra incorporação dos lipossomas pelas células. É facilitada na presença de moléculas vectorizadoras na superfície do lipossoma ou quando a carga deste é contrária à da célula, que normalmente é negativa. A absorção do fármaco pela célula vai depender da difusão passiva através de um gradiente de concentrações;
- d) fagocitose/endocitose: processos efectuados por células com actividade fagocítica, que incorporam os lipossomas em endossomas (formados pela invaginação da membrana plasmática e com um valor de pH entre 5 e 5,5), os quais posteriormente se fundem com os lisossomas, sendo os lipossomas sujeitos a digestão celular a um valor de pH aproximadamente igual a 4,5. Durante a digestão dos lipossomas, é libertado o seu conteúdo aquoso, o qual pode permanecer no interior dos lisossomas até que ocorra a exocitose, especialmente se os fármacos se encontram na forma carregada numa extensão significativa a valores de pH baixos, ou podem ir lentamente passando para o citoplasma;
- e) fusão: resulta na mistura completa dos lípidos do lipossoma com os da célula e na libertação do seu conteúdo para o citoplasma. No caso dos MLVs, pode-se verificar a manutenção de bicamadas lipídicas interiores e a libertação do lipossoma no

citoplasma, o qual está apto a interactuar com os organelos celulares. Este processo é preferível à endocitose, uma vez que é evitada a degradação pelas enzimas lisossómicas.

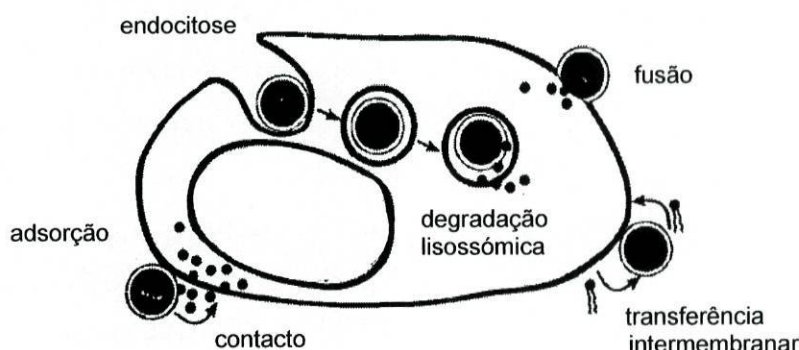


Figura 1.12: Representação dos diferentes tipos de interacção dos lipossomas com uma célula (adaptado de [5]).

Uma das vantagens da utilização dos lipossomas como transportadores de fármacos, como referido anteriormente, reside na possibilidade de usar estes sistemas como vectores de fármacos. A vectorização ou direccionamento de fármacos ("drug targeting") consiste em promover o transporte do fármaco para os locais de acção específicos, ao nível de um determinado órgão, tecido ou célula. A utilização de vectores pode ser efectuada de diferentes formas [5]:

a) vectorização natural: tira partido dos mecanismos de defesa naturais do organismo contra as partículas estranhas na corrente sanguínea. Assim, a rápida captura dos lipossomas pelo SRE, como fígado e baço, pode permitir o tratamento de infecções e carcinomas nesses órgãos. A captura e direccionamento dos lipossomas para locais sujeitos a infecções e inflamações podem também ser explorados para o tratamento destes estados patológicos;

b) vectorização física: depende do direccionamento do lipossoma a um determinado local, o qual apresenta alterações que induzem a libertação do conteúdo dos lipossomas. A vectorização física envolve o uso de lipossomas sensíveis a parâmetros como a temperatura, pH ou luz. A sensibilidade das vesículas à temperatura pode ser controlada usando lípidos com diferentes temperaturas de transição de fase, de modo que quando atingem locais de temperatura mais elevada, como nos processos inflamatórios, libertam o seu conteúdo. Os locais onde se verifique infecção ou inflamação e os tumores possuem um valor de pH mais baixo comparativamente ao

tecido saudável, o que pode ser explorado no desenvolvimento de lipossomas sensíveis ao pH. Os lipossomas sensíveis ao pH libertam, então, o seu conteúdo em locais que apresentem um valor de pH mais baixo e podem ser constituídos, por exemplo, por fosfatidiletanolamina, os quais se tornam instáveis quando o valor de pH baixa. Pela escolha de lípidos sensíveis à luz, é possível preparar lipossomas que libertam o seu conteúdo quando expostos a luz de comprimento de onda apropriado;

c) vectorização compartimental: consiste na administração dos lipossomas nos locais onde o efeito terapêutico é requerido. A artrite, por exemplo, pode ser tratada por administração intra-articular;

d) vectorização mediada por ligando: envolve a modificação da superfície dos lipossomas pela introdução de moléculas, como glicolípidos, glicoproteínas, lipopolissacarídeos ou anticorpos, que se irão ligar especificamente a receptores na célula-alvo.

As principais vias de administração dos lipossomas são a via intra-venosa, intra-peritoneal e sub-cutânea. A principal desvantagem destas vias é a captura dos lipossomas pelo SRE. A via oral é uma via de administração preferencial, mas a administração de lipossomas oralmente é dificultada pelas condições agressivas do tracto gastrointestinal, nomeadamente baixo valor de pH estomacal, presença de enzimas degradativas e acção detergente dos sais biliares no intestino. Adicionalmente, existe o problema de moléculas e agregados de maiores dimensões não conseguirem ser absorvidos pelas células do tracto digestivo. A absorção de lipossomas pode ser conseguida pontualmente por endocitose, mas em reduzida extensão. A utilização de MLVs pode constituir uma alternativa para transportar o fármaco através do tracto gastrointestinal até ao local de absorção, pois vai ocorrer uma degradação gradual das múltiplas bicamadas. Contudo, será necessário o desenvolvimento de vesículas mais robustas, como lipossomas totalmente ou parcialmente polimerizados, capazes de suportarem as condições gastrintestinais [1, 5].

Existem ainda outras vias usadas em formulações contendo lipossomas, como por exemplo, a via tópica (especialmente em cosmética) e a via pulmonar (principalmente para a veiculação de fármacos que vão actuar localmente).

Apesar do considerável número de estudos científicos sobre o desenvolvimento de formulações farmacêuticas com lipossomas, poucas foram as que efectivamente atingiram o mercado. As aplicações dos lipossomas, nesta área, incluem o transporte de fármacos usados no tratamento de infecções provocadas por fungos (como

anfotericina B), vírus (como vidarina) ou por bactérias (como penicilina e antriciclina), no tratamento do cancro (como doxorubicina) ou de inflamações (como hidrocortisona). Podem ainda transportar imunoadjuvantes, como vacinas (por exemplo, da hepatite B) ou isótopos (por exemplo, isótopo de índio, ^{111}In) para radiologia [5].

Do exposto se depreende que, seja qual for o fármaco sujeito a encapsulação ou a via de administração, um requisito fundamental para o desenvolvimento de uma formulação com lipossomas é uma elevada taxa de encapsulação do fármaco a ser veiculado, quer o fármaco se associe com a membrana lipídica, quer seja aprisionado no compartimento aquoso interno. Uma taxa elevada de encapsulação diminui o custo das formulações e os riscos de toxicidade associada aos lipossomas. Outro parâmetro importante prende-se com a perda que se pode observar para um fármaco num determinado sistema lipossomal durante o trajecto desde a sua administração até ao local de acção. A diminuição da perda pode ser conseguida pelo aumento do grau de insaturação ou do comprimento das cadeias fosfolipídicas, ou ainda, por adição de colesterol ou por utilização de um lípido da mesma carga do ião a ser encapsulado [30].

1.2. ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTERÓIDES

Os anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) são os fármacos mais usados e difundidos na terapêutica. De facto, desde 1893, quando o químico alemão Félix Hoffman motivou a Bayer a produzir o ácido acetilsalicílico (patenteado como aspirina), os agentes anti-inflamatórios não esteróides passaram a ser os fármacos mais largamente prescritos e usados em todo o mundo, pelas suas propriedades analgésicas, antipiréticas e anti-inflamatórias [31]. Contudo, apesar do largo uso destes agentes, somente em 1971 foi esclarecido o seu mecanismo de acção por John Vane [32]. Este autor propôs que os anti-inflamatórios semelhantes à aspirina combatiam o processo inflamatório pela inibição da enzima ciclooxigenase (COX), impedindo, deste modo, a síntese de prostaglandinas. De facto, apesar dos AINEs constituírem um grupo heterogéneo de compostos, com elevada diversidade estrutural, compartilham as mesmas propriedades farmacológicas (efeitos terapêuticos e colaterais).

A COX, enzima que catalisa a biossíntese das prostaglandinas, também denominada de prostaglandina sintetase ou prostaglandina endoperóxido sintetase, foi isolada em 1976 e clonada em 1988 [31]. Posteriormente, em 1991 foi identificado um gene codificador de uma segunda isoforma da enzima, denominada de ciclooxigenase-2 (COX-2) [31]. Sabe-se, actualmente, que dois genes expressam duas isoformas da enzima ciclooxigenase: a ciclooxigenase-1 (COX-1) e a ciclooxigenase-2 [31, 33]. Com a descoberta da COX-2, isoforma induzida e expressa predominantemente durante o processo inflamatório, uma nova perspectiva terapêutica emergiu com o desenvolvimento de fármacos mais selectivos e detentores de menos efeitos adversos. Mais recentemente, novas motivações para o uso clínico e para a pesquisa de novos fármacos foram encontradas com a descrição de uma terceira variante da ciclooxigenase, denominada de ciclooxigenase-3 (COX-3) [31].

Actualmente, o número de fármacos anti-inflamatórios não esteróides disponíveis no mercado é muito elevado, encontrando-se distribuídos por várias classes químicas apresentadas na Tabela 1.3.

Os AINEs além de serem distribuídos em diferentes classes químicas (Tabela 1.3), também podem ser classificados como inibidores não selectivos da COX-2 ou inibidores selectivos da COX-2 [31]. Os fármacos estudados nesta dissertação pertencem a diferentes classes químicas e apresentam diferentes selectividades relativamente à COX-2. Assim, dos AINEs estudados (diclofenac, clonixina, etodolac, piroxicam, tenoxicam e indoprofeno), apenas o etodolac é um inibidor selectivo da COX-2 [33, 34].

As doenças reumáticas, como a artrite reumatóide, constituem um exemplo de doenças inflamatórias, salientando-se pela elevada prevalência e pela incapacidade funcional, temporária ou definitiva, que originam. Assim, o grupo dos anti-inflamatórios encontra nestas doenças o seu grande campo de aplicação, podendo, contudo, serem administrados em muitas outras situações clínicas, como dor crónica ou aguda, desordens músculo-esqueléticas agudas, traumas e outras artropatias, como espondilose anquilosante [35, 36].

Tabela 1.3: Classificação química dos anti-inflamatórios não esteróides.

Classe química	AINEs
1. Salicilatos	Ácido acetilsalicílico Salicilato de sódio Salicilato de metilo Diflunisal Flunfenizal Sufasalazina
2. Ácidos arilalcanóicos	
a) Derivados do ácido acético	Diclofenac Etodolac Tolmetina Indometacina Acemetacina Sulindac
b) Derivados do ácido propiónico	Indoprofeno Ibuprofeno Naproxeno Flurbiprofeno Fenoprofeno Cetoprofeno
c) Derivados do ácido butírico	Nabumetona
3. Ácidos antranílicos	Ácido mefenâmico Ácido meclofenâmico Ácido flufenâmico
4. Pirazolonas	Fenilbutazona Dipirona Antipirina Azopropazona Sulfimpirazona
5. Oxicamos	Tenoxicam Piroxicam Meloxicam Lornoxicam
6. Derivados da sulfonamida	Nimesulide
7. Ácidos nicotínicos	Clonixina
8. Derivados da anilina	Fenacetina Acetaminofeno ou paracetamol
9. Coxibes	Celecoxibe Rofecoxibe

1.2.1. Inflamação

A inflamação é um mecanismo complexo, essencialmente de defesa dos seres vivos e indispensável à sua sobrevivência. Pode ser desencadeado por vários tipos de agentes agressores, como físicos (traumatismos, radiações ultravioletas), químicos (peptídeos hormonais, aminas, lípidos, neurotransmissores), biológicos (microorganismos patogénicos) ou patológicos (hipertermia, reacções imunológicas). Caracteriza-se por rubor, calor, edema, acometimento da função tecidual local, dor e incapacidade funcional, evoluindo em fases distintas: a) aguda, a qual corresponde à resposta inicial para a lesão celular, conduz à produção de prostaglandinas e é dominada por vasodilatação e aumento da permeabilidade capilar; b) subaguda, caracterizada por infiltração de leucócitos e macrófagos e conduz à fagocitose ou neutralização dos organismos estranhos; e c) crónica, com degenerescência e fibrose dos tecidos [35]. A reacção inflamatória tem como objectivo final a reparação do dano tecidual e a eliminação do agente agressor. Contudo, este delicado equilíbrio lesão/reparação pode ser perturbado pelo excesso de permanência do agente agressor ou do seu deficiente combate, assumindo, conseqüentemente, a reacção inflamatória uma forma crónica e destrutiva, sendo a artrite reumatóide um exemplo clínico deste fenómeno [35].

Dos mediadores intervenientes na reacção inflamatória salientam-se, pela sua importância, os metabolitos do ácido araquidónico, especialmente as prostaglandinas (PGs). As prostaglandinas são compostos químicos de natureza lipídica que existem praticamente em todos os tecidos animais e estão envolvidas em diversos processos fisiológicos e patológicos, incluindo, por exemplo, a vasodilatação ou a vasoconstrição, o aumento ou a diminuição da tensão arterial, a protecção da mucosa gástrica (aumento da secreção de muco e manutenção da camada superficial hidrofóbica de protecção), inibição da secreção ácida gástrica, aumento do fluxo sanguíneo renal, contracção ou relaxamento da musculatura brônquica ou uterina, ovulação, metabolismo ósseo, resposta imunológica, fenómenos inflamatórios, hiperalgesia, regulação da actividade quimiotáctica celular, coagulação sanguínea, entre outras [31, 33].

As PGs são sintetizadas enzimaticamente a partir de ácidos gordos insaturados com vinte átomos de carbono. Três ácidos estão na base dessa síntese, nomeadamente o ácido diomo- γ -linolénico (8, 11, 14-icosatrienóico), o ácido araquidónico (5, 8, 11, 14-icosatetraenóico) e o ácido timnodónico (5, 8, 11, 14,

17-icosapentanóico). Destes, o mais abundante é o ácido araquidónico, existindo o ácido diomo- γ -linolénico numa quantidade significativamente menor, enquanto que o ácido timnodónico não existe nos mamíferos. Estes ácidos são formados, no fígado, a partir de ácidos gordos essenciais polinsaturados, nomeadamente o ácido linoleico e o ácido linolénico, e são depois utilizados na formação das membranas celulares, onde se encontram incorporados em moléculas de fosfolípidos ou ligados ao colesterol [35].

A designação química das PGs baseia-se na molécula do ácido prostanóico [7-(2-octil-ciclopentil)-heptanóico], ácido com vinte átomos de carbono, monocarboxílico, possuidor de um anel ciclopentano e que, por si mesmo, não manifesta qualquer actividade prostaglandínica. Esta estrutura é, assim, comum a todas as PGs naturais, sendo estas distinguidas pelo grau de insaturação das cadeias laterais e pelas substituições no anel.

As PGs são normalmente englobadas em três séries (1, 2, 3), dependendo do número de duplas ligações na cadeia lateral. Cada um dos ácidos, anteriormente citados, pode funcionar como precursor da síntese de uma série de PGs. Deste modo, os ácidos diomo- γ -linolénico araquidónico e timnodónico formam, respectivamente, as séries PG₁, PG₂ e PG₃. As prostaglandinas pertencentes à série 2 são as mais importantes e as mais bem conhecidas no Homem (Figura 1.13) [35].

Além da insaturação das cadeias laterais, as PGs são também agrupadas de acordo com as funções químicas ligadas ao anel presente na sua estrutura. Os diferentes grupos das PGs são simbolizados por letras de A a I (por exemplo, PGG e PGH) [35].

Existem ainda outros mediadores envolvidos no processo inflamatório, como os tromboxanos (TXs) e os leucotrienos (LTs), para além das PGs. As prostaglandinas e os tromboxanos, formados pela enzima ciclooxygenase, são colectivamente designados de prostanóides [35]. Os mediadores referidos não são armazenados nas células, são sintetizados como resultado de uma perturbação na membrana celular, actuam localmente e são rapidamente metabolizados, pelo que são apenas detectáveis por curtos períodos de tempo.

A libertação do ácido araquidónico, precursor da síntese das PGs da série 2, a partir das moléculas de fosfolípidos, deve-se à acção de um grupo de enzimas, do qual se destacam as fosfolípases da membrana celular, sobretudo a fosfolípase A₂ [35]. De facto, os fosfolípidos podem ser hidrolisados por uma série de fosfolípases específicas, conforme se pode observar na Figura 1.14.

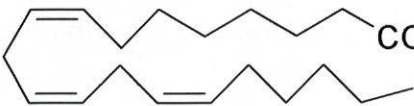
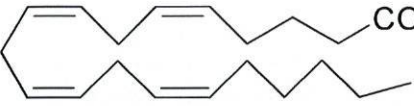
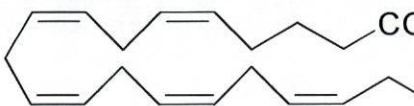
Ácidos precursores	Séries
 Ácido diomo-γ-linolénico	PGs₁ TXs₁ LTs₃
 Ácido araquidónico	PGs₂ TXs₂ LTs₄
 Ácido timnodónico	PGs₃ TXs₃ LTs₅

Figura 1.13: Ácidos gordos precursores das diferentes séries de prostaglandinas (PGs), tromboxanos (TXs) e leucotrienos (LTs).

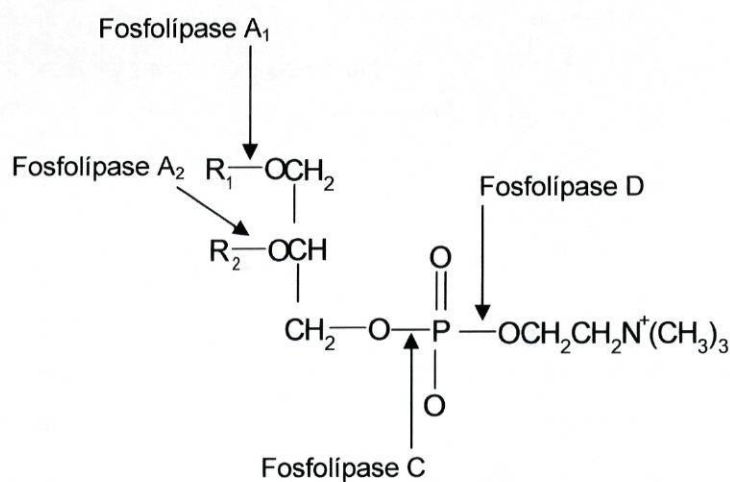


Figura 1.14: Locais de acção lítica das diferentes fosfolípases na molécula de fosfatidilcolina (adaptado de [1]).

Como é possível observar na Figura 1.14, a fosfolipase A_2 hidrolisa especificamente o ácido gordo colocado na posição 2 da molécula dos fosfolípidos membranares, particularmente a fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina, libertando o ácido araquidónico (ou o ácido diomo- γ -linolénico, para a síntese das prostaglandinas da série 1). Parece, contudo, que o mediador final capaz de influenciar a actividade da fosfolipase A_2 é o ião cálcio, pelo aumento da sua concentração intracelular [35]. O ácido araquidónico (ou o ácido diomo- γ -linolénico) libertado vai ser metabolizado por três vias enzimáticas diferentes, designadamente a via da ciclooxygenase, a via da lipoxigenase e a via da monoxigenase (Figura 1.15).

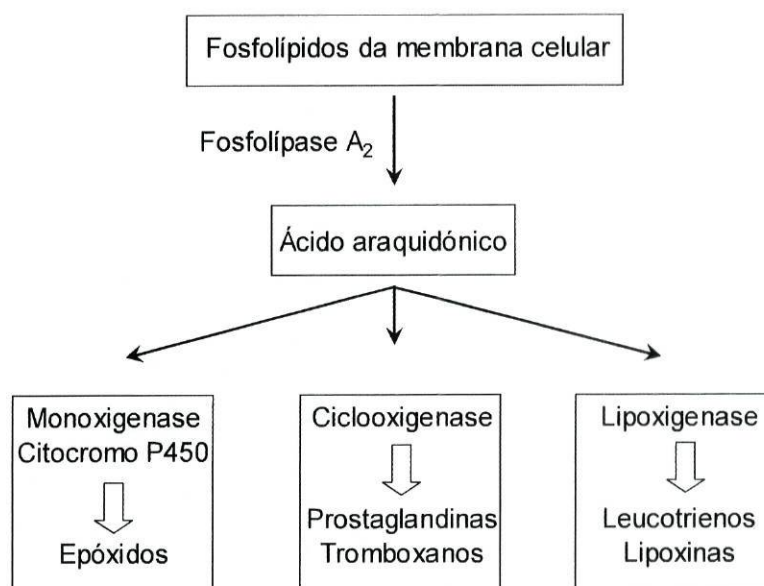


Figura 1.15: Esquema das diferentes vias de metabolização do ácido araquidónico, com referência aos principais metabolitos formados.

Via da ciclooxygenase: A via da ciclooxygenase depende da actuação de um complexo enzimático, globalmente designado por ciclooxygenase, que conduz à biossíntese das prostaglandinas e dos tromboxanos. Este complexo enzimático apresenta dois locais activos com actividades distintas [27], nomeadamente um com actividade de endoperóxido redutase e o outro com actividade de peroxidase. A síntese das prostaglandinas inicia-se, portanto, com a actividade da ciclooxygenase catalisando a adição de oxigénio molecular ao ácido araquidónico e a sua ciclização, para formar, inicialmente, o endoperóxido cíclico prostaglandina G_2 (PGG_2).

Posteriormente, a mesma enzima, pela sua actividade peroxidase, catalisa a redução desta prostaglandina para formar a prostaglandina H_2 (PGH_2). As PGG_2 e PGH_2 apresentam pouca actividade e servem como substrato para a formação de diferentes prostaglandinas como a prostaglandina D_2 (PGD_2), a prostaglandina E_2 (PGE_2), a prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), a prostaciclina (PGI_2) e os tromboxanos [31]. Apesar da etapa de transformação do ácido araquidónico a PGH_2 ser comum em todos os sistemas celulares, o metabolismo posterior das PGH_2 depende da célula em questão, das enzimas que esta contem e da presença de co-factores.

As prostaglandinas possuem, de um modo geral, uma acção vasodilatadora, ao contrário do tromboxano A_2 . Este contrai a parede dos vasos e activa a agregação das plaquetas, enquanto a prostaciclina provoca efeitos contrários. A PGD_2 é libertada pelos mastócitos activados por estímulos alérgicos ou outros, enquanto que a PGE_2 inibe a acção de linfócitos T supressores e outras células que participam nas respostas alérgicas ou inflamatórias. As prostaglandinas têm, ainda, outras acções já anteriormente referidas, como a sensibilização dos nociceptores e estimulação dos centros hipotalâmicos de termorregulação [31].

A existência de uma forma indutível da COX foi descrita, em 1989, por Needleman e colaboradores, os quais demonstraram a sua indução por estímulos inflamatórios e por citocinas [31]. Passou-se, então, a admitir, em virtude das características distintas da sua expressão, a existência das isoformas COX-1 e COX-2, como já referido anteriormente. A COX-1 foi a primeira a ser caracterizada, é expressa constitutivamente, está presente em todas as células, principalmente nos vasos sanguíneos, plaquetas, estômago e rins e apresenta funções fisiológicas, conduzindo à produção de prostaglandinas anti-trombogénicas, citoprotectoras da mucosa gástrica e envolvidas na manutenção da função plaquetária e renal (Figura 1.16). A COX-2 é uma enzima indutível, geralmente não detectável nos tecidos saudáveis, mas o seu nível aumenta dramaticamente em tecidos inflamados. Pode ser induzida na presença de citocinas (interleucina-1, interleucina-2 e do factor α de necrose tumoral), ésteres de forbol, factores de crescimento e endotoxinas, sendo expressa caracteristicamente por células envolvidas no processo inflamatório, como macrófagos, monócitos e sinovócitos (Figura 1.16) [37]. Contudo, desde a descoberta original da COX-2 em células estimuladas pelas citocinas, verificou-se que esta enzima também é expressa em tecidos não inflamados, incluindo o rim, cérebro, tumores do cólon, ossos e cartilagem [35, 36]. As prostaglandinas e citocinas (interleucina-6) encontram-se também implicadas na fisiopatologia de algumas

doenças degenerativas encefálicas, como a esclerose múltipla, demência associada à síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA) e na doença de Alzheimer [31].

Por outro lado, a expressão da COX-2 pode ser inibida por glicocorticóides, interleucina-4, interleucina-10 e interleucina-13, enquanto que a PGE_2 promove um aumento da expressão da COX-2. Esta enzima pode também ser regulada de modo pós-transcricional. A perda de regulação pós-transcricional da COX-2, pela mutação de proteínas que interactivam especificamente em determinados elementos do ácido ribonucleico mensageiro (ARN_m) da enzima, pode resultar num aumento da expressão da COX-2, cujo mecanismo tem sido proposto como factor crucial envolvido na carcinogénese do intestino [31].

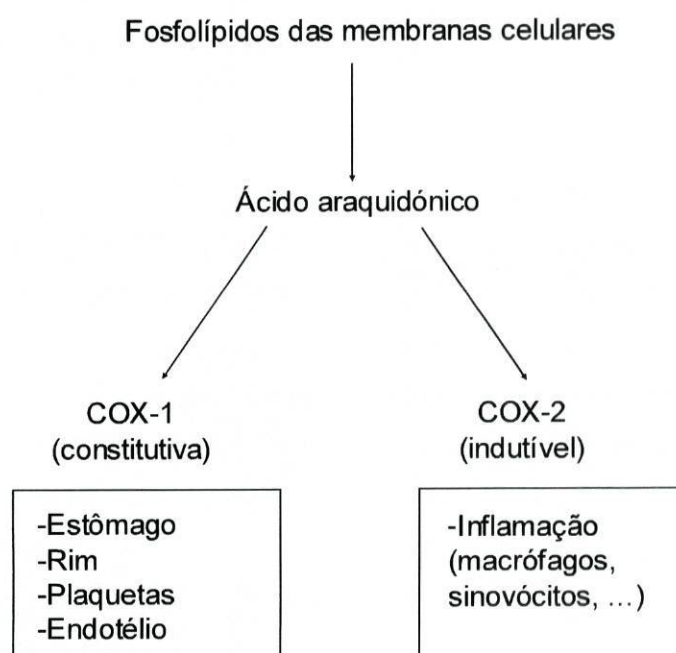


Figura 1.16: Papel das COX-1 e COX-2 na síntese das PGs em diversos órgãos e células.

A COX-1 e a COX-2 são proteínas integrais que se localizam dentro do folheto interno da bicamada lipídica das membranas do retículo endoplasmático e numa menor extensão na membrana nuclear [27]. Embora diferenças notáveis tenham sido observadas ao nível da localização (os genes das isoformas COX-1 e COX-2 estão localizados nos cromossomas 9 e 1, respectivamente, mas apresentam homologia genética em cerca de 60% das suas regiões codificantes [31]), da expressão e regulação dos genes da COX no ADN e ARN, a estrutura da proteína e a função

enzimática, nomeadamente, afinidade e capacidade de conversão do ácido araquidónico em PGH_2 , são significativamente similares. Apresentam, contudo, algumas diferenças, como o tamanho do local activo, que é menor na COX-1 comparativamente ao da COX-2 [33]. De facto, apesar dos locais activos das enzimas COX-1 e COX-2 serem semelhantes, a simples presença de um grupo metilo adicional na COX-2, procedente da substituição da isoleucina na posição 523 da COX-1 pela valina na COX-2, é suficiente para originar um maior espaço no local activo, o que permite a interacção de fármacos mais volumosos [33, 34].

A expressão de uma terceira variante catalítica da COX (COX-3) foi demonstrada em estudos *in vitro* com linhagens de macrófagos. A singularidade é que a expressão desta variante não originaria prostaglandinas pró-inflamatórias, mas um membro da família das ciclopentanonas, a 15desoxe- Δ PGJ_2 , com actividade anti-inflamatória. Se a hipótese de uma terceira ciclooxigenase com actividade anti-inflamatória estiver correcta, a sua expressão pode resultar em períodos típicos de remissão do processo inflamatório, como tem sido constatado em algumas doenças crónicas, como a artrite reumatóide [31].

A COX-3, possivelmente uma variante da COX-1, uma vez que é produzida pelo mesmo gene desta isoforma, encontra-se distribuída principalmente no córtex cerebral, medula espinal e coração. Com efeito, a COX-3 é formada pelo mesmo gene da COX-1, mas retem no seu ARN_m o intron 1, que induz a inserção de 30 a 34 aminoácidos na estrutura que corresponderia à da COX-1 [38]. A COX-3 é inibida por fármacos como o paracetamol que apresenta actividade analgésica e antipirética e uma pequena capacidade inibitória das COX-1 e COX-2. Com efeito, muitos autores consideram que a descoberta desta variante da ciclooxigenase pode explicar o mecanismo de acção do paracetamol [38, 39]. Assim, postulou-se que a inibição da COX-3 poderia representar o mecanismo central primário pelo qual os fármacos analgésicos e antipiréticos do tipo AINE desenvolveriam as suas actividades na redução da dor e da febre [31, 38, 39].

Via da lipoxigenase: Pela via da enzima lipoxigenase (principalmente a 5- e a 12-lipoxigenases no Homem), o ácido araquidónico origina os ácidos hidroperoxieicosatetranoico (5-HPETE; 12-HPETE e 15-HPETE). Dada a instabilidade dos HPETE, estes produtos são convertidos nos ácidos gordos hidroxieicosatetranoico (HETE). Nos leucócitos, os 15-HPETE podem ser convertidos em metabolitos trihidroxilados designados por lipoxinas. Os leucotrienos surgem pela acção da 5-lipoxigenase e por adição da glutathione e possuem, por um lado, actividade

quimiotáctica e quimiocinética, promovendo a chamada de leucócitos e acelerando os seus movimentos, e, por outro lado, aumentam a permeabilidade vascular [35].

Via da monoxigenase. Finalmente, a via da monoxigenase é uma via de metabolização do ácido araquidónico que envolve a sua oxigenação através das epoxigenases do citocromo P-450. Formam-se os ácidos epoxieicosatrienóicos (EET), também conhecidos por epóxidos (5, 6-, 8, 9-, 11, 12- e 14, 15-epóxido) e os dióis respectivos. Estes metabolitos são produzidos, por exemplo, a nível do fígado, supra-renal, endotélio e nas plaquetas e apresentam uma forte actividade biológica. Tem sido referido, a título de exemplo, uma actividade vasoconstritora para o 14, 15-epóxido mas, em contrapartida, uma intensa actividade vasodilatadora para os 5, 6-, 8, 9- e 11, 12-epóxidos [35].

O estudo dos prostanóides e dos leucotrienos e a sua relação com os processos biológicos é, hoje em dia, ainda motivo de estudo, já que uma maior compreensão dos mecanismos de acção das PGs, TXs e LTs, permite um melhor aperfeiçoamento dos agentes terapêuticos anti-inflamatórios.

1.2.2. Mecanismo de acção dos AINEs

Antes de 1970, era já conhecida a participação das prostaglandinas na dor, febre e inflamação, o que levou John Vane e colaboradores a admitirem que os AINEs pudessem actuar por inibição da produção destes autacóides. Várias observações posteriores reforçaram esta hipótese, nomeadamente a libertação de PGs na lesão celular, a presença de PGs no exsudado inflamatório e a capacidade de síntese destes mediadores pela generalidade das células. Contudo, este mecanismo de acção proposto por John Vane, em 1971 [32], e considerado, desde então, o principal mecanismo de acção deste grupo de fármacos, não explica todos os seus efeitos, pois a eficácia terapêutica destes compostos observa-se, em regra, em doses bastantes superiores às necessárias para produzirem uma inibição significativa da síntese das PGs [34, 35]. Assim, outros mecanismos complementares dos AINEs incluem, por exemplo, desacoplamento da fosforilação oxidativa, estabilização da membrana dos lisossomas, efeitos na membrana celular (como alteração da fluidez membranar e estabilização das proteínas membranares), inibição da fosfolípase A₂, C e outras enzimas membranares, efeitos na migração celular (como a migração dos monócitos e a agregação e adesão de neutrófilos), inibição da fagocitose dos leucócitos, actividade



fibrinolítica, estabilização da ligação sulfidril-dissulfídica, efeitos antioxidantes, hiperpolarização das membranas neuronais, supressão da produção do factor reumatóide por diminuição da actividade das células T, alteração do metabolismo da cartilagem e actividade anti-tumoral [34, 40-50].

Os anti-inflamatórios apresentam efeito analgésico pela inibição da produção local de prostaglandinas capazes de sensibilizar as terminações nervosas locais da dor, aquando da inflamação. Com efeito, não parecem ter um efeito predominante ao nível do sistema nervoso central, mas sim do periférico. Nos processos inflamatórios, a febre deve-se à acção da PGE_2 libertada pelo hipotálamo anterior, após acção das citocinas, sobre o centro termorregulador. A actividade antipirética dos anti-inflamatórios está relacionada com a inibição da síntese das prostaglandinas, pelo que estes fármacos apenas possuem acção sobre a temperatura em estados febris, não actuando em situações de hiperpirexia [35].

Como analgésicos, os AINEs são eficazes na dor ligeira, tanto na dor inflamatória como na pós-operatória, sendo o efeito analgésico máximo, geralmente, muito inferior ao dos opiáceos. Todavia, não causam nem depressão respiratória nem dependência física. Todos possuem efeito antipirético e analgésico, e como anti-inflamatórios, têm como principal indicação o tratamento das doenças músculo-esqueléticas, como é o caso da generalidade dos reumatismos. O tratamento da dismenorreia e gota são outras indicações destes compostos.

A generalidade dos AINEs são ácidos fracos e esta propriedade favorece a sua acumulação ao nível dos tecidos inflamados. Estes compostos são rápida e extensamente absorvidos após administração oral, ocorrendo o pico sérico normalmente num intervalo de 3 horas. Ligam-se extensamente às proteínas plasmáticas e sofrem geralmente metabolização hepática e excreção renal e biliar. A concentração dos AINEs no líquido sinovial é inferior à atingida no plasma, mas é menos variável e desce mais lentamente do que os níveis plasmáticos, o que pode permitir que os AINEs sejam administrados com uma menor frequência [35]. Ao contrário do ácido acetilsalicílico, em que a duração da acção depende da velocidade com que é regenerada a COX, pois é um inibidor irreversível, os compostos que a inibem reversivelmente têm uma duração de acção dependente da semi-vida plasmática [35, 37].

À inibição da síntese das prostaglandinas pode atribuir-se, também, o extenso conjunto de efeitos secundários (descritos posteriormente) apresentados por estes fármacos, como os efeitos a nível gastrointestinal. De facto, como referido

anteriormente, a importante descoberta da existência de duas isoformas da enzima ciclooxigenase, a COX-1 e a COX-2, permitiu verificar que as acções anti-inflamatórias são devidas à inibição da COX-2, enquanto que os efeitos secundários serão atribuídos à inibição da COX-1 (Figura 1.17). Esta foi a base teórica para o desenvolvimento dos inibidores selectivos da COX-2, que possuiriam apenas efeitos antipiréticos, analgésicos e anti-inflamatórios, sem causar os efeitos adversos gastrintestinais.

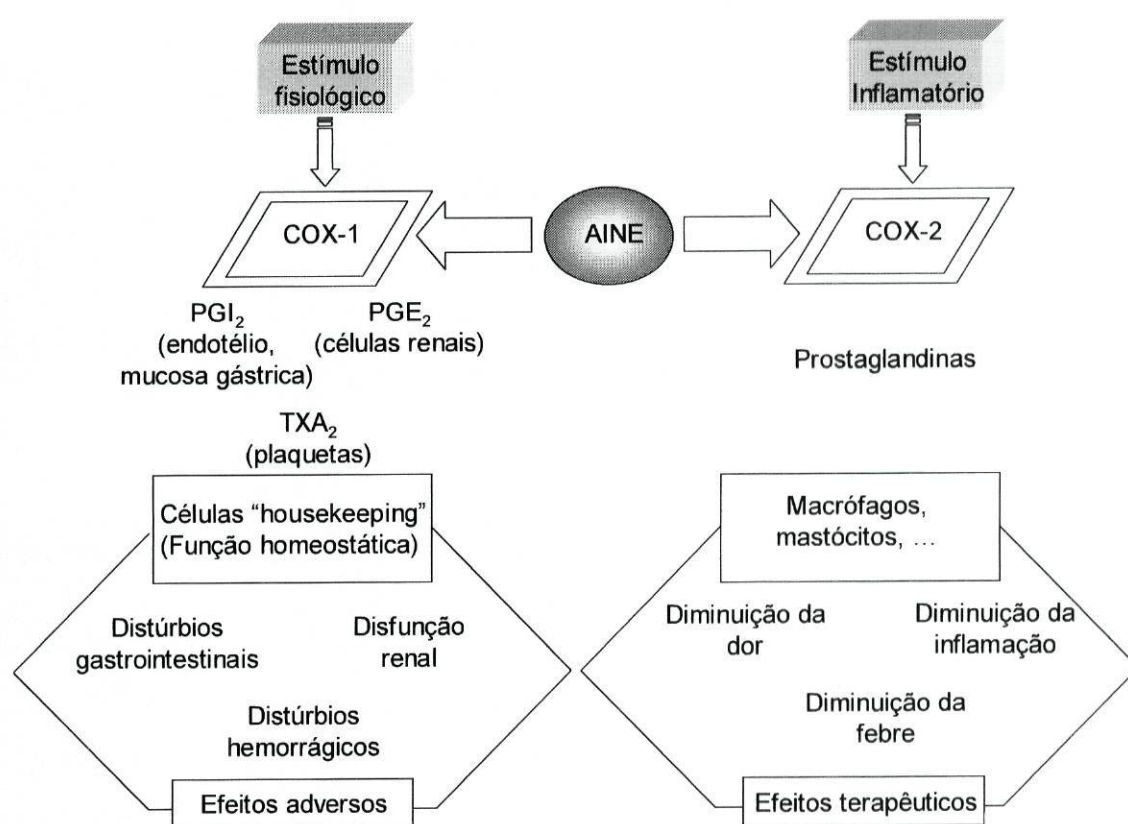


Figura 1.17: Representação esquemática da acção dos AINEs na homeostasia (COX-1) e na inflamação (COX-2).

1.2.3. Efeitos adversos e interações dos AINEs

As reacções adversas dos AINEs aumentam significativamente com a idade e, como estes fármacos são comumente usados na população mais idosa, os seus efeitos adversos podem provocar sérios riscos [36]. Os efeitos adversos mais comuns

dos AINEs são apresentados na Tabela 1.4, ocorrendo os principais problemas a nível dos sistemas gastrointestinal, renal e cardiovascular.

Tabela 1.4: Efeitos adversos relacionados com a terapia de AINEs (adaptado de [36]).

Sistema	Efeitos adversos
Gastrointestinal	Úlcera gástrica
	Esofagite e estenose
	Erosão do intestino
Renal	Insuficiência renal aguda reversível
	Perturbação do equilíbrio hidroelectrolítico
	Insuficiência renal crónica e fibrose intestinal
Cardiovascular	Exacerbação da hipertensão
	Exacerbação da insuficiência cardíaca congestiva
	Exacerbação da angina
Hepático	Transaminases elevadas
	Insuficiência hepática fulminante (rara)
Sistema nervoso central	Dor de cabeça
	Sonolência
	Confusão
	Meningite asséptica
Hematológico	Trombocitopenia
	Anemia hemolítica
	Agranulocitose e anemia aplástica
Outros	Exacerbação da asma
	Erupção cutânea

Muitas das reacções adversas dos AINEs, como referido anteriormente, dependem da inibição da síntese das PGs, como por exemplo, irritação da mucosa gastrointestinal, inibição da agregação plaquetária, diminuição da filtração glomerular, paralisia da motilidade uterina, disfunção renal e reacções de hipersensibilidade. A irritação gastrointestinal é a reacção adversa mais frequente dos AINEs e a responsável pelo abandono da terapêutica por uma grande percentagem de doentes. Embora seja mais frequente com a administração oral, também ocorre por via parentérica. Os efeitos adversos gastrointestinais dos AINEs estão associados à supressão da

expressão constitutiva da COX-1, resultando em lesão gástrica, hemorragia, ulceração e perfuração gástrica ou duodenal [31]. Deste modo, os efeitos colaterais gastrintestinais foram atribuídos à baixa selectividade de inibição destes compostos sobre a COX-2. Consequentemente, os AINEs que inibem preferencialmente a COX-2 parecem possuir melhor tolerância digestiva. Com efeito, a indústria farmacêutica tem feito muitas e diferentes tentativas para eliminar ou diminuir a seriedade dos efeitos tóxicos dos AINEs a nível gastrintestinal. Elas incluem o desenho de pró-fármacos, de AINEs dadores de monóxido de zoto (NO), de inibidores selectivos da COX-2, assim como a preparação de formulações com revestimento entérico e de libertação controlada, complexos de ciclodextrina-AINEs e de AINEs associados a fosfolípidos (já existem evidências que os AINEs associados com fosfolípidos dipolares reduzem a toxicidade gastrintestinal) [35, 51].

As plaquetas sintetizam as PGE_2 e as PGD_2 e o tromboxano A_2 (TXA_2). O TXA_2 é um potente agregante plaquetário, cuja síntese é inibida pela generalidade destes compostos. Por outro lado, as células endoteliais dos vasos sintetizam a PGI_2 (prostaciclina) que, ao contrário do TXA_2 , é um antagonista da agregação plaquetária. Da inibição da agregação plaquetária podem resultar hemorragias diversas, nomeadamente a nível da pele e das mucosas. No entanto, este efeito secundário, a inibição da agregação plaquetária, tem sido usado na prevenção e tratamento das doenças cardiovasculares.

As PGE e as PGF , sintetizadas sobretudo no fim da gestação, exercem um efeito estimulante da contracção uterina. Assim, a inibição da síntese destas PGs pode levar ao prolongamento da gravidez.

Normalmente, os AINEs não interferem com a função renal. Todavia, sempre que houver retenção hidrossalina, a administração dos AINEs aumenta o risco de insuficiência renal.

As reacções de hipersensibilidade, rinite vasomotora, edema angioneurótico, urticária generalizada e asma são bastante frequentes com os AINEs, sendo responsáveis por cerca de 29% destas reacções em adultos.

Tem sido descrito um grande número de interacções entre os AINEs e diversos fármacos [35, 36]. Na Tabela 1.5 são apresentados alguns exemplos a ter em consideração e que exigem, por vezes, a modificação das doses ou mesmo a sua contra-indicação. Assim, é necessário ter atenção aquando da prescrição de AINEs, particularmente a doentes idosos, uma vez que estes possuem, frequentemente,

várias morbidades, devendo, portanto, todas as prescrições serem tomadas em consideração.

Tabela 1.5: Principais interacções com os anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) (adaptado de [35]).

Fármaco	AINE	Efeito
		Interacções farmacocinéticas
Lítio	Todos os AINEs (excepto sulindac, AAS?)	Inibição da excreção renal do lítio. Aumento da concentração sérica
Fenitoína	Fenilbutazona Oxifenilbutazona	Inibição do metabolismo da fenitoína com aumento das concentrações plasmáticas, risco de toxicidade
	Outros AINEs	Deslocação da fenitoína das proteínas plasmáticas, reduzindo a concentração total
Metotrexato	Provavelmente todos os AINEs	Redução da depuração de metotrexato com aumento da concentração plasmática e risco de toxicidade severa
Digoxina	Todos os AINEs	Redução potencial da função renal (particularmente em indivíduos muito jovens e nos idosos) com diminuição da depuração da digoxina, aumento da concentração plasmática e risco de toxicidade. (Ausência de interacção se a função renal estiver normal)
Aminoglicosídeos	Todos os AINEs	Redução da função renal em indivíduos susceptíveis, redução da depuração do aminoglicosídeo e aumento da concentração plasmática.
Anti-hipertensores bloqueadores β diuréticos antagonistas ECA vasodilatadores	Todos os AINEs (excepto sulindac?)	Redução do efeito hipotensor. Provavelmente relacionada com a síntese das PGs renais (retenção de sódio e água) e da síntese das PGs vasculares (aumento da vasoconstrição)
Diuréticos	Todos os AINEs (excepto sulindac?)	Redução dos efeitos diurético e natriurético; pode agravar insuficiência cardíaca congestiva
Anticoagulantes	Todos os AINEs	Aumento da actividade anticoagulante (inibição da agregação plaquetária) com risco de hemorragias

Abreviatura: ECA: enzima de conversão da angiotensina; ?: incerteza.

Como referido anteriormente, a generalidade dos AINEs liga-se extensamente às proteínas plasmáticas, podendo, portanto, interferir com outros medicamentos que também se liguem a essas proteínas em grande extensão, como os antidiabéticos orais.

Os efeitos adversos dos AINEs podem ser reduzidos se for tida em atenção a dose e duração de tratamento, factores de risco concomitantes e o uso combinado de fármacos mais selectivos para reduzir a actividade da doença. Além disso, os efeitos adversos gastrintestinais dos AINEs podem ser tratados e prevenidos pelo uso de uma terapia apropriada em combinação com os AINEs [36]. Assim, por exemplo, a administração de um análogo da PGE₁, o misoprostol, e a inibição da secreção do ácido clorídrico pelo omeprazol e anti-histamínicos, por exemplo, previnem a irritação digestiva [35]. Em casos de úlcera péptica com infecção pelo *Helicobacter pylori*, não se deve usar nenhum dos AINEs, mesmo os inibidores selectivos da COX-2, para evitar a agressão simultânea pelos dois processos.

Não convém esquecer, contudo, que a inflamação é um mecanismo de defesa, e o seu combate com anti-inflamatórios pode ser prejudicial. Só nos casos em que esta resposta não específica do sistema imune é mais prejudicial do que benéfica é que faz sentido o recurso a um anti-inflamatório. Habitualmente ensaia-se um AINE durante uma semana, para avaliar tanto a eficácia como o grau de tolerância. Consoante os casos, pode ser necessário aumentar ou diminuir a dose ou proceder à sua substituição, porque tanto a eficácia como a tolerabilidade variam de doente para doente. De facto, existe uma grande variabilidade na resposta clínica aos AINEs entre pacientes individuais [36]. Por exemplo, um doente pode não tolerar um determinado AINE e dar-se bem com outro composto quimicamente semelhante [35].

1.2.4. AINEs inibidores não selectivos e selectivos da COX-2

Os AINEs inibidores selectivos da COX-2 foram desenvolvidos com o objectivo de manter a eficácia dos não selectivos, mas sem a sua capacidade de provocarem efeitos colaterais gastrintestinais e renais. No entanto, todos os AINEs, mesmo os inibidores selectivos da COX-2, são capazes de inibir, embora em variados graus, tanto a COX-1 como a COX-2 [37].

Os AINEs têm um amplo espectro de acção e tem sido sugerido que as suas diferenças, quer de eficácia, quer de tolerabilidade, são devidas, em parte, à

diversidade observada nas suas propriedades físico-químicas (por exemplo, constantes de acidez (pK_a), solubilidade, coeficiente de partição), que determinam a sua distribuição no organismo. Geralmente, os AINEs são ácidos orgânicos, sendo esta propriedade importante para a farmacocinética, ulcerogenicidade gástrica e farmacodinâmica, especialmente para a sua eficácia inibitória na síntese de prostaglandinas, uma vez que a carga negativa é um importante requisito estrutural para que ocorra interacção com a ciclooxigenase [28]. Contudo, apesar desta generalização, existem importantes diferenças nas propriedades físico-químicas dos diferentes AINEs, que constituem, provavelmente, a base da sua maior ou menor tolerabilidade.

Muitos dos fármacos inibidores não selectivos da COX-2 e com menor tolerância gástrica são ácidos carboxílicos que apresentam valores de pK_a entre 3 e 5 e uma alteração significativa da percentagem das formas presentes num determinado intervalo de pH [27, 34]. Consequentemente, alguns dos fármacos inibidores selectivos da COX-2 com grupos sulfonamida ou sulfona apresentam valores de pK_a relativamente superiores (maiores que 5,5), o que pode contribuir para a sua menor capacidade ulcerogénica, além da limitada capacidade de inibição da COX-1 na mucosa gastrintestinal [34]. No entanto, as propriedades físico-químicas referidas podem não ser, por si só, suficientes para a compreensão dos menores efeitos adversos a nível gastrintestinal, pois o etodolac, por exemplo, também apresenta uma menor capacidade de produzir efeitos adversos a nível da mucosa gástrica e é um ácido carboxílico [34]. Adicionalmente, é questionável o facto de um inibidor altamente selectivo para a COX-2 ter menor propensão para provocar ulceração gástrica. De facto, estudos mostraram que mesmo os AINEs inibidores selectivos da COX-2 são capazes de inibir significativamente a síntese da prostaglandina E_2 , em concentrações encontradas *in vivo* [37]. Por outro lado, existem vários AINEs, como o ibuprofeno, que possuem uma apreciável actividade inibitória da COX-1, assim como da COX-2, e que têm uma baixa capacidade de conduzir ao aparecimento de úlceras gastrintestinais [34, 52]. Neste contexto, as características físico-químicas, assim como as acções bioquímicas e celulares dos inibidores não selectivos da COX-2 com menor capacidade ulcerogénica devem ser relevantes para a compreensão da sua aparentemente menor ulcerogenicidade gastrintestinal. Deste modo, deve-se ter em consideração as propriedades físico-químicas, que podem contribuir para uma maior tolerância a nível da mucosa gástrica, independentemente da selectividade dos AINEs para a COX-2 [34].

Um aspecto intrigante sobre os diversos graus de toxicidade e actividade anti-inflamatória dos AINEs está relacionado com o facto de ocorrerem não apenas entre compostos não relacionados estruturalmente, mas também dentro de uma mesma classe química de AINEs [53, 54]. Os AINEs do grupo dos oxicamos, por exemplo, são convencionalmente conhecidos como uma classe de fármacos altamente eficazes no tratamento da artrite e em inflamações pós-operatórias [55], mas apesar das suas semelhanças estruturais, apresentam diferentes efeitos biológicos. De facto, em adição à elevada eficácia anti-inflamatória, o meloxicam parece ter uma menor capacidade ulcerogénica e apresenta uma menor irritação local tecidular e gástrica comparativamente a outros AINEs, incluindo outros oxicamos. Vários autores tentaram demonstrar quais os factores que poderiam explicar a menor ulcerogenicidade verificada para o meloxicam e outros AINEs inibidores selectivos da COX-2 [54, 56]. Alguns autores consideraram que a maior tolerabilidade poderia ser explicada justamente pela capacidade desses AINEs inibirem preferencialmente a COX-2 [53, 57, 58]. Outros autores, considerando os grupos sulfona presentes no meloxicam e em outros inibidores selectivos da COX-2, propuseram que os valores de pK_a mais elevados (maiores que 5,5) destes compostos (Figura 1.18), dos que o normalmente apresentados pelos inibidores não selectivos da COX-2, poderiam contribuir para uma menor irritação local da mucosa gástrica independentemente da selectividade para a COX-2 ou menor capacidade de inibição da COX-1 do estômago [34, 59]. Contudo, apesar das hipóteses propostas, outros anti-inflamatórios ou mesmo oxicamos, como o piroxicam, o tenoxicam e o lornoxicam, apresentam esses mesmos grupos sulfona e não são considerados AINEs inibidores selectivos da COX-2, nem apresentam maior tolerância gástrica do que os que não apresentam esses grupos [53]. Consequentemente, torna-se claro que a patogénese dos AINEs a nível gastrointestinal é complexa, havendo efeitos não mediados pelas prostaglandinas que conduzem a danos, como o efeito tónico, que pode resultar de uma interacção entre os AINEs e os fosfolípidos das membranas e/ou da barreira hidrofóbica da mucosa [34, 51, 60-63], em adição aos efeitos locais e sistémicos causados pela inibição da enzima membranar COX. Todavia, apesar dos precisos pormenores da relação entre as propriedades físico-químicas e os efeitos dos fármacos ainda não estarem completamente estabelecidos, há indicações, particularmente em consideração à susceptibilidade dos danos gastrintestinais, que estas propriedades físico-químicas são de maior importância [34]. Assim, investigações adicionais são essenciais para reconhecer todos os factores físico-químicos que estão na base das interacções dos

fármacos inibidores selectivos para a COX-2 comparativamente aos inibidores não selectivos.

Convém ainda referir que os inibidores selectivos da COX-2 apresentam eficácia terapêutica relativamente similar a AINEs não selectivos, por exemplo, no tratamento da artrite reumatóide, o celecoxibe e o diclofenac apresentaram eficácia analgésica e anti-inflamatória similar e apesar do celecoxibe e de outros inibidores selectivos da COX-2 causarem menos complicações gastrintestinais, outros efeitos adversos mais proeminentes com o seu uso puderam ser observados, entre eles urticária, cefaleia, alergia (como edema da língua) e insuficiência renal [31]. Adicionalmente, outros estudos científicos demonstraram maior risco de desenvolvimento de eventos cardiovasculares trombóticos com o uso do rofecoxibe, incluindo enfarte do miocárdio, angina instável, trombos cardíacos e mesmo morte súbita [31].

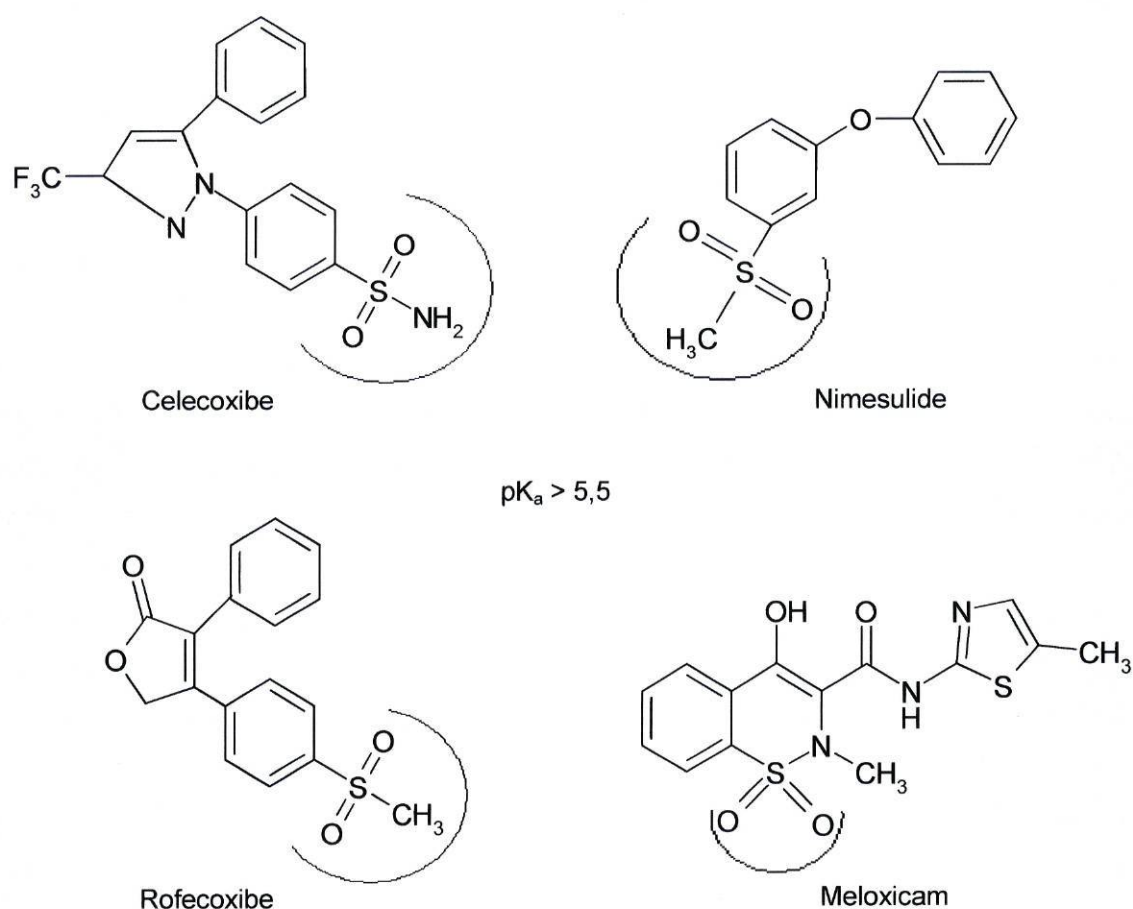


Figura 1.18: Estrutura química dos AINEs selectivos da COX-2 (adaptado de [34]).

Finalmente, o custo dos medicamentos é sempre de ponderar, sobretudo em tratamentos de longa duração. De facto, com o objectivo de reduzir os efeitos indesejáveis dos AINEs não selectivos, os inibidores selectivos da COX-2 passaram a ser amplamente usados. Contudo, o custo desses medicamentos é, por vezes, bastante superior ao dos primeiros. A avaliação de custo/benefício deve ser feita para a tomada de decisão de uso, justificado, primordialmente, em pacientes idosos (mais propensos às reacções adversas gastrintestinais) e nos que têm antecedentes de úlcera ou hemorragia digestiva induzida por AINE.

Neste contexto, mesmo as últimas gerações de anti-inflamatórios inibidores selectivos da COX-2 apresentam ainda sucesso limitado, em virtude, principalmente, dos seus efeitos colaterais. No entanto, graças à descoberta de outras variantes da ciclooxigenase, ao emprego da modulação molecular na obtenção de compostos mais selectivos e às novas aplicações para esses agentes, inclusive no tratamento do cancro e da doença de Alzheimer, o interesse nos AINEs permanece tão actual quanto à 100 anos atrás.

1.2.5. AINEs em estudo

A estrutura química dos AINEs estudados é apresentada na Figura 1.19, e em seguida descrevem-se as suas principais características.

Diclofenac (*Voltaren*[®], *Cataflam*[®], *Flameril*[®], *Diclofenac Merck*[®], ...): O diclofenac (ácido [2-(2, 6-dicloroanilina)fenil] acético) apresenta-se como um pó amarelado e solúvel em água. É um ácido fraco, possuindo um valor de pK_a igual a 3,99 [64]. Este AINE é rapidamente absorvido por via oral, obtendo-se os picos plasmáticos 1 a 2 horas após a administração e apresenta uma semivida curta (cerca de 1 a 2 horas). É intensamente metabolizado no organismo, sendo os metabolitos excretados pelo rim e pela bile, não se verificando acumulação em caso de insuficiência renal. Liga-se às proteínas plasmáticas numa percentagem superior a 99%. O diclofenac usa-se na dose de 150 - 200 mg/dia, em 2 a 4 tomas, tendo-se mostrado eficaz em situações inflamatórias crónicas, como a artrite reumatóide, osteoartroses e em situações agudas como a crise gotosa e reumatismos periarticulares. Os seus efeitos adversos são semelhantes aos de outros anti-inflamatórios, predominando a irritação digestiva [35].

Piroxicam (*Feldene*[®], *Reumoxicam* *Medinfar*[®], *Flexar*[®], *Piroxicam Ratiopharm*[®]...) e *tenoxicam* (*Tilcotil*[®], *Doxicam*[®], *Tenalgin*[®], *Tenoxicam Generis*[®]...): O piroxicam (1,1-dióxido de 4-hidroxi-2-metil-*N*-2-piridinil-2*H*-1,2-benzotiazina-3-carboxamida) e o tenoxicam (1,1-dióxido de 4-hidroxi-2-metil-*N*-2-piridinil-2*H*-tieno-1,2-tiazina-3-carboxamida) apresentam-se como um pó amarelo, praticamente insolúvel em água. O piroxicam apresenta um valor de pK_{a1} igual a 1,86 e um pK_{a2} de 5,46 e para o tenoxicam os valores de pK_{a1} e pK_{a2} são iguais a 1,07 e 5,34, respectivamente [27, 28]. Os oxicamos são bem absorvidos no tubo digestivo e metabolizados em grande extensão no fígado, não se observando elevação dos níveis plasmáticos em doentes com insuficiência renal. São fármacos lentamente eliminados, com semivida plasmática bastante longa, em alguns estudos cerca de 48 horas, para o que contribui a circulação entero-hepático. Deste modo, estes medicamentos podem ser administrados numa única dose diária. A toxicidade destes compostos é semelhante à dos outros anti-inflamatórios não esteróides.

Etodolac (*Articular*[®], *Dualgan*[®], *Sodolac*[®]): O etodolac (ácido 1,8-dietil-1,3,4,9-tetra-hidropirano[3,4-*b*]indol-1-acético) apresenta-se como um pó branco pouco solúvel em água. É um ácido fraco, apresentando um valor de pK_a igual a 4,65 [65]. O etodolac é rapidamente absorvido por via oral. O pico sérico é obtido 1 hora após a administração. Este composto liga-se às proteínas em grande percentagem (igual ou superior a 99%), tendo uma semivida média de 6 a 7 horas. É eliminado principalmente por via urinária e numa menor percentagem pela biliar. Como é um inibidor selectivo da COX-2 apresenta maior tolerabilidade gástrica.

Indoprofeno (*não existe comercializado em Portugal* [66]): O indoprofeno (ácido 4-(1,3-di-hidro-1-oxo-2*H*-isoindol-2-il)- α -metilbenzenoacético) apresenta-se como um pó branco pouco solúvel em água. Apresenta um valor de pK_a igual a 4,25 [67]. É rapidamente e quase completamente absorvido pelo tubo digestivo, liga-se extensamente às proteínas plasmáticas, numa percentagem que pode atingir os 99%. É intensamente metabolizado dando origem a compostos inactivos, os quais são quase totalmente eliminados por via urinária. Os seus efeitos adversos são semelhantes aos demais AINEs.

Clonixina (*Clonix*[®], *Algimate*[®]): A clonixina (ácido 2-(3-cloro-*o*-toluidina) nicotínico) apresenta-se como um pó branco, solúvel em água. Apresenta uma boa absorção oral e atravessa facilmente a barreira hemato-encefálica. Apresenta uma baixa ligação às proteínas plasmáticas. Sofre metabolização hepática (30%) e eliminação renal (70% na sua forma intacta), estando contra-indicada em casos de

insuficiência renal. A clonixina, por ser um anti-inflamatório não esteróide com uma potente acção analgésica, é normalmente indicada em síndromes dolorosas de qualquer etiologia, intensidade ou localização.

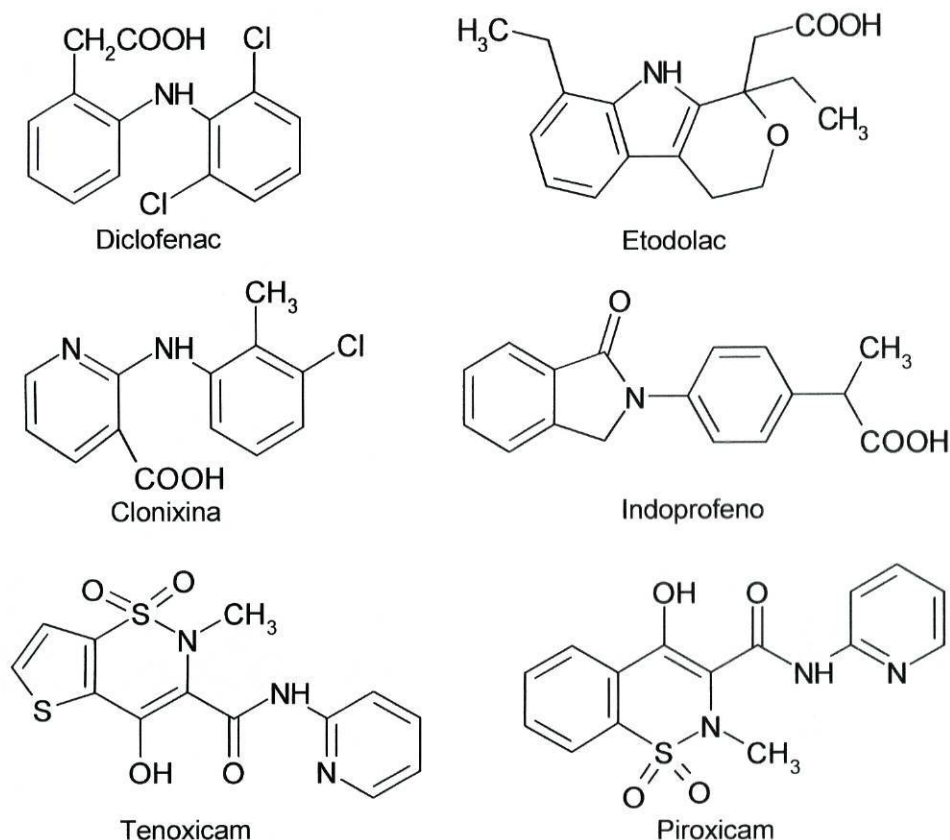


Figura 1.19: Estrutura química do diclofenac, etodolac, clonixina, indoprofeno, tenoxicam e piroxicam.

1.3. INTERACÇÃO FÁRMACO/LIPOSSOMA E SUA IMPORTÂNCIA

A acção dos fármacos divide-se geralmente em duas fases: a fase farmacocinética e a fase farmacodinâmica. A fase farmacocinética compreende os processos de absorção, distribuição, metabolismo e eliminação, enquanto que a fase farmacodinâmica inclui os processos biológicos envolvidos na interacção dos fármacos com os seus alvos de acção, como receptores e enzimas. Assim, durante o trajecto de uma substância activa, desde o seu local de absorção até aos locais onde a sua acção será exercida, é inevitável a passagem de variadas barreiras lipídicas formadas pelas

membranas celulares. As ligações ou interacções dos fármacos com os componentes lipídicos da membrana podem ser responsáveis pela sua acção tóxica ou podem, igualmente, explicar o seu modo de acção, uma vez que estes fármacos podem actuar a um nível membranar ou podem ter que passar através de membranas antes de atingirem um alvo intracelular. Deste modo, o mecanismo de acção dos fármacos que actuam em receptores membranares parece integrar dois passos: o primeiro, envolvendo a partição do fármaco na estrutura lipídica membranar e o segundo, a sua orientação adequada para que ocorra ligação ao receptor. Neste modelo é evidente a importância da extensão da ligação do fármaco à membrana lipídica, fenómeno quantificado pelo coeficiente de partição, bem como a localização e orientação adequada do fármaco na membrana, uma vez que deverá ajustar-se, na posição adequada, ao centro activo do receptor. Da interacção fármaco-membrana pode ainda resultar uma alteração das propriedades físico-químicas da própria membrana que, por si só, pode contribuir de uma forma directa para o seu mecanismo de acção ou, consequentemente, originar uma alteração da actividade das enzimas membranares.

O conhecimento exaustivo da interacção dos fármacos com as membranas lipídicas é, assim, crucial para a compreensão dos parâmetros de distribuição dessas moléculas no organismo, bem como para o estabelecimento das relações entre as suas propriedades físico-químicas e os parâmetros farmacológicos apresentados, relações importantes no estudo e desenho de novos compostos com maior eficácia terapêutica e com menores efeitos secundários, a maior parte das vezes indesejáveis. Neste contexto, a importância do conhecimento das interacções de uma substância farmacologicamente activa com as membranas biológicas deve-se, principalmente, aos efeitos que estas podem exercer na sua eficácia terapêutica por condicionarem a sua biodisponibilidade (relacionada com a concentração suficiente no local alvo para permitir actividade biológica) ou por terem um papel primordial no seu mecanismo de acção. Estas interacções dependem simultaneamente das propriedades das próprias membranas, determinadas pela respectiva composição, mas também das propriedades físico-químicas e estrutura química dos próprios fármacos. Assim sendo, a interacção de um fármaco com a membrana depende da sua lipofilia que condiciona igualmente a sua localização. Na Figura 1.20 apresenta-se, de uma forma esquematizada, as possíveis localizações de um fármaco na membrana. Assim, os fármacos hidrossolúveis podem localizar-se no interior ou exterior aquoso das membranas ou estabelecer ligações electrostáticas ou iónicas com a zona interfacial, enquanto que os fármacos lipossolúveis podem localizar-se no núcleo hidrocarbonado

das mesmas e estabelecer ligações hidrofóbicas ou de Van der Waals, e, finalmente, os fármacos anfipáticos podem dispor-se por forma a que a sua parte hidrofóbica fique perto das cadeias hidrocarbonadas dos fosfolípidos e a parte hidrofílica perto dos grupos polares.

O estudo das interacções dos fármacos com as membranas biológicas *in vivo* apresenta, contudo, muitas dificuldades e complexidade. Assim, de modo a obviar estes problemas, foram desenvolvidos numerosos sistemas destinados a ensaios *in vitro*. Dos modelos desenvolvidos, os lipossomas mostraram ser uma das estruturas mais adequadas, pois têm a capacidade de simular muitas das propriedades das membranas celulares, além de serem de fácil preparação e utilização.

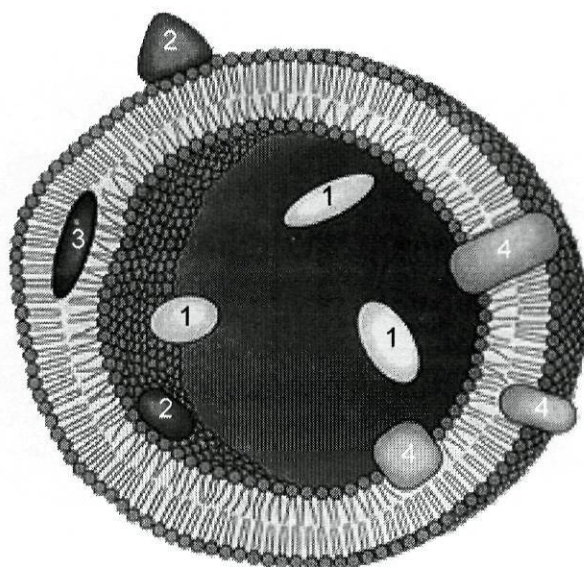


Figura 1.20: Localizações possíveis de fármacos ou outros compostos hidrossolúveis sem (1) ou com estabelecimento de ligações electrostáticas ou iónicas (2), lipossolúveis (3) ou anfipáticos (4) nas membranas fosfolípídicas (adaptado de [1]).

Os lipossomas têm sido usados em múltiplos ensaios envolvendo AINEs, nomeadamente para estudar os seus efeitos a nível das propriedades das membranas [24, 26, 68] e das suas propriedades antioxidantes [44, 69]. De facto, é bem sabido que os AINEs, em geral, são capazes de sofrer partição entre os fluidos biológicos e as membranas biológicas, pelo que diversas técnicas têm sido sugeridas para investigar o comportamento destes fármacos em membranas naturais e artificiais, como os lipossomas. Com efeito, para que os AINEs exerçam a sua acção inibitória na

síntese das prostaglandinas, por exemplo, estes fármacos necessitam de passar através da membrana celular e, adicionalmente, penetrar no interior da membrana endoplasmática para alcançar a enzima COX. Adicionalmente, tem sido sugerido que as variações, quer na eficácia, quer na tolerabilidade dos AINEs, são devidas, em parte, às diferenças das suas propriedades físico-químicas (por exemplo, pK_a , solubilidade, coeficiente de partição), que determinam, como referido anteriormente, a sua distribuição no organismo [27]. Parece evidente que, qualquer que seja a aplicação de lipossomas contendo AINEs, nomeadamente como modelos membranares, é de extrema importância o estabelecimento preciso das características e das consequências da interacção dos AINEs com os lipossomas ou membranas celulares, quer a nível da alteração das propriedades físico-químicas do fármaco, quer do lípido.

Pelas questões apresentadas, a determinação o mais completa possível do grau e do tipo de interacções que os AINEs possam estabelecer com os fosfolípidos constituintes das biomembranas é fundamental para o exacto conhecimento do modo de acção, biodistribuição e efeitos secundários apresentados por estes fármacos, assim como na elucidação de como as diferenças intrínsecas entre as moléculas podem ser relacionadas com os seus diferentes comportamentos *in vivo*. Para além destas questões farmacológicas, a nível do desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas baseadas em fosfolípidos ou em lipossomas, a compreensão da interacção dos AINEs em estudo com os lípidos é também de extrema importância no conhecimento das características de encapsulação destes fármacos.

1.4. BIBLIOGRAFIA

1. Lasic, D. D. (1993). *Liposomes - from Physics to Applications*. Elsevier. New York.
2. New, R. R. C. (1990). *Liposomes - a practical approach*. Oxford University Press. New York.
3. Santos, N. C., Castanho, M. A. R. B. (2002). Lipossomas: a bala mágica acertou? *Quim. Nova*, 25 (6B) 1181-1185.
4. Sessa, G., Weissmann, G. (1968). Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. *J. Lipid Res.*, 9: 310-318.
5. Jones, M. N., Chapman, D. (1995). *Micelles, monolayers and biomembranes*. Wiley-Liss Inc. New York.
6. Sharma, A., Sharma, U. S. (1997). Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *Int. J. Pharm.*, 154: 123-140.
7. Vemuri, S., Rhodes, C. T. (1995). Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharm. Acta Helv.*, 70: 95-111.
8. Fendler, J. H. (1982). *Membrane Mimetic Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc. New York.
9. Seelig, A. (1987). Local anesthetics and pressure: a comparison of dibucaine binding to lipid monolayers and bilayers. *Biochim. Biophys. Acta*, 899: 196-204.
10. Cevc, G. (1990). Membrane electrostatics. *Biochim. Biophys. Acta*, 1131: 311-382.
11. Voet, D., Voet, J. G. (2004). *Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc. U.S.A.
12. Hope, M. J., Bally, M. B., Webb, G., Cullis, P. R. (1985). Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochim. Biophys. Acta*, 812: 55-65.
13. Perkins, W. R., Minchey, S. R., Ahl, P. L., Janoff, A. S. (1993). The determination of liposome captured volume. *Chem. Phys. Lipids*, 64: 197-217.
14. Mayer, L. D., Hope, M. J., Cullis, P. R., Janoff, A. S. (1985). Solute distributions and trapping efficiencies observed in freeze-thawed multilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, 817: 193-196.

15. Machleidt, H., Royh, S., Seeman, P. (1972). The hydrophobic expansion of erythrocyte membranes by the phenol anesthetics. *Biochim. Biophys. Acta*, 255: 178-189.
16. Franks, N. P., Lieb, W. R. (1986). Partitioning of long-chain alcohols into lipid bilayers: implications for mechanisms of general anesthesia. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83: 5116-5120.
17. Goormaghtigh, E., Ruyschaert, J. M. (1984). Anthracycline glycoside-membrane interactions. *Biochim. Biophys. Acta*, 779: 271-288.
18. Castanho, M. A. R. B., Prieto, M., Jameson, D. M. (1999). The pentane macrolide antibiotic filipin prefers more rigid DPPC bilayers: a fluorescence pressure dependence study. *Biochim. Biophys. Acta*, 1419: 1-14.
19. Chakraborty, H., Banerjee, R., Sarkar, M. (2003). Incorporation of NSAIDs in micelles: implication of structural switchover in drug-membrane interaction. *Biophys. Chem.*, 104: 315-325.
20. Rhodes, D. G., Newton, R., Butler, R., Herbette, L. (1992). Equilibrium and kinetic studies of the interactions of salmeterol with membrane bilayers. *Mol. Pharmacol.*, 42: 596-602.
21. Wiseman, H., Cannon, M., Arnstein, H. R. V., Halliwell, B. (1990). Mechanism of inhibition of lipid peroxidation by tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen introduced into liposomes. *FEBS Lett.*, 274: 107-110.
22. Wiseman, H., Smith, C., Halliwell, B., Cannon, M., Arnstein, H. R. V., Lennard, M. S. (1992). Droloxifene (3-hydroxytamoxifen) has membrane antioxidant ability: Potencial relevance to its mechanism of therapeutic action in breast cancer. *Cancer Lett.*, 66: 61-68.
23. Wiseman, H., Quinn, P., Halliwell, B. (1993). Tamoxifen and related compounds decrease membrane fluidity in liposomes. *FEBS Lett.*, 330: 53-56.
24. Castro, B., Gameiro, P., Lima, J. L. F. C., Matos, C., Reis, S. (2001). Location and partition coefficients of antiinflammatory drugs in EPC liposomes. A fluorescence quenching study using n-(9-antroyloxy)-stearic probes. *Colloids Surf., A*, 190: 205-212.
25. Castro, B. d., Gameiro, P., Lima, J. L. F. C., Matos, C., Reis, S. (2001). Interaction of drugs with hexadecylphosphocholine micelles. Derivative spectroscopy, acid-base and solubility studies. *Mat. Sci. Eng., C*, 18: 71-78.

26. Matos, C., Castro, B., Gameiro, P., Lima, J. L. F. C., Reis, S. (2004). Zeta potential measurements as a tool to quantify the effect of charged drugs on the surface potential of egg phosphatidylcholine liposomes. *Langmuir*, 20: 369-377.
27. Luger, P., Daneck, K., Engel, W., Trummelitz, G., Wagner, K. (1996). Structure and physicochemical properties of meloxicam, a new NSAID. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 4: 175-187.
28. Tsai, R.-S., Carrupt, P.-A., Tayar, N. E., Giroud, Y., Andrade, P., Testa, B., Breé, F., Tillement, J. P. (1993). Physicochemical and Structural Properties of Non Steroidal Anti-inflammatory oxicams. *Helv. Chim. Acta*, 76: 842-854.
29. Mason, R. P., Rhodes, D. G., Herbette, L. G. (1991). Reevaluating equilibrium and kinetic binding parameters for lipophilic drugs based on a structural model for drug interaction with biological membranes. *J. Med. Chem.*, 34: 869-877.
30. Tyrrell, D. A., Heath, T. D., Colley, C. M., Ryman, B. E. (1976). New aspects of liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 457: 259-302.
31. Carvalho, W. A., Carvalho, R. D. S., Rios-Santos, F. (2004). Analgésicos inibidores específicos da ciclooxigenase-2: avanços terapêuticos. *Rev. Bras. Anesthesiol.*, 54: 448-464.
32. Vane, J. R. (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature*, 231: 232-235.
33. Hawkey, C. J. (2001). COX-1 and COX-2 inhibitors. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 15: 801-820.
34. Rainsford, K. D. (1999). Profile and Mechanisms of Gastrointestinal and Other Side Effects of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs). *Am. J. Med.*, 107: 27S-36S.
35. Esteves, A., Mota, A., Matias, A., Sebastião, A., Teixeira, A. A., Gouveia, A. M., Sarmiento, A., Lima, B. S., Carvalho, B. M., Ribeiro, C. F., Moura, D., Araújo, D., Pereira, E. R., Brandão, F., Vale, F. M. d., Almeida, F., Teixeira, F., Rodrigues, H. L., Azevedo, I., Ribeiro, J. A., Tavares, J. C., Gonçalves, J., Polónia, J., Almeida, J. A. F. d., Garrett, J., Monteiro, J. G., Rico, J. M. G. T., Nunes, J. P., Matos, M. B., Silva, M. V. d., Pestana, M., Garrett, M. C., Caramona, M. M., Castro, M., Silva, P. S. d., Begonha, R., Ivo, R. d. S., Guimarães, S., Magina, S., Macedo, T. R. A., Durão, V., Osswald, W. (2001). *Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas*, 4ª edição. Porto Editora, Lda., Porto.

36. Brooks, P. (1998). Use and Benefits of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs. *Am. J. Med.*, 104: 9S-13S.
37. Cryer, B., Feldman, M. (1998). Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am. J. Med.*, 104: 413-421.
38. Chandrasekharan, N. V., Dai, H., Roos, K. L., Evanson, N. K., Tomsik, J., Elton, T. S., Simmons, D. L. (2002). COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure and expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 13926-13931.
39. Schwab, J. M., Beiter, T., Linder, J. U., Laufer, S., Schulz, J. E., Meyermann, R., Schluesener, H. (2003). COX-3 a virtual pain target in humans? *FASEB J.*, 17: 2174-2175.
40. Ferreira, S. H., Vane, J. R. (1974). New aspects of the mode of action of nonsteroid anti-inflammatory drugs. *A. Rev- Pharmac.*, 14: 57-73.
41. Bomalaski, J. S., Hirata, F., Clarke, M. A. (1986). Aspirin inhibits phospholipase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 139: 115-121.
42. Brooks, P. M., Day, R. O. (1991). Nonsteroidal antinflammatory drugs- differences and similarities. *New Engl. J. Med.*, 324: 1716-1725.
43. Halliwell, B., Hoult, J. R., Blake, D. R. (1988). Oxidants, inflammation, and anti-inflammatory drugs. *FASEB J.*, 2: 2867-2873.
44. Facino, R. M., Carini, M., Aldini, G., Saibene, L., Macciocchi, A. (1993). Antioxidant profile of nimesulide, indomethacin and diclofenac in phosphatidylcholine liposomes (PCL) as membrane model. *Int. J. Tissue React.*, 15: 225-234.
45. Knazek, R. A., Liu, S. C., Dave, J. R., Christy, R. J., Keller, J. A. (1981). Indomethacin causes a simultaneous decrease of both prolactin binding and fluidity of mouse liver membranes. *Prostag. Med.*, 6: 403-411.
46. Beccerica, E., Piergiacomini, G., Curatola, G., Ferretti, G. (1989). Effect of antirheumatic drugs on lymphocyte membrane fluidity in rheumatoid arthritis: a fluorescence polarization study. *Pharmacology*, 38: 16-22.
47. Klein, T., Ullrich, V., Pfeilschifter, J., Nüsing, R. (1998). On the induction of Cyclooxygenase-2, inducible nitric oxid synthase and soluble phospholipase A₂ in rat mesangial cells by a nonsteroidal anti-inflammatory drug: the role of cyclic AMP. *Mol. Pharmacol.*, 53: 385-391.

48. Berg, J., Fellier, H., Christoph, T., Grarup, J., Stimmeder, D. (1999). The analgesic NSAID lornoxicam inhibits cyclooxygenase (COX)-1/2, inducible nitric oxide (iNOS), and the formation of interleukin (IL)-6 in vitro. *Inflamm. Res.*, 48: 369-379.
49. Behl, C. (1999). Alzheimer's disease and oxidative stress: implications for novel therapeutic approaches. *Prog. Neurobiol.*, 57: 301-323.
50. Barker, J. L., Levitan, H. (1971). Salicylate: effect on membrane permeability of molluscan neurons. *Science*, 172: 1245-1247.
51. Khazaeinia, T., Jamali, F. (2003). A comparison of gastrointestinal permeability induced by diclofenac-phospholipid complex with diclofenac acid and its sodium salt. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 6: 352-359.
52. MacDonald, T. M., Morant, S. V., Robinson, G. C., Shield, M. J., McGilchrist, M. M., Murray, F. E., McDevitt, D. G. (1997). Association of upper gastrointestinal toxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs with the continued exposure: cohort study. *BMJ*, 315: 1333-1337.
53. Engelhardt, G., Homma, D., Schlegel, K., Schnitzler, C., Utzmann, R. (1996). General Pharmacology of Meloxicam-Part I: Effects on CNS, Gastric Emptying, Intestinal Transport, Water, Electrolyte and Creatinine Excretion. *Gen. Pharmacol.*, 27: 673-677.
54. Distel, M., Mueller, C., Bluhmki, E. (1996). Selective inhibition of human cyclooxygenase-2 by meloxicam. *Inflammopharmacology*, 4: 71-81.
55. Hawkey, C. J. (1999). COX-2 Inhibitors. *Lancet*, 353: 307-314.
56. Lúcio, M., Ferreira, H., Lima, J. L. F. C., Reis, S. (2006). Interactions between oxicams and membrane bilayers - an explanation for their different COX selectivity. *Med. Chem.*, 2: 447-456.
57. DeWitt, D. L., Meade, E. A., Smith, W. L. (1993). Prostaglandin H synthase isoenzyme selectivity: the potential for safer nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Am. J. Med.*, 95: 40S-46S.
58. Vane, J., Botting, J. (1996). Improved Nonsteroidal Anti Inflammatory Drugs-COX-2 Enzyme Inhibitors. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.
59. Rainsford, K. D. (1978). Structure-activity relationships of non steroidal anti-inflammatory drugs I: gastric ulcerogenic activity. *Agents Actions*, 8: 587-605.
60. Lichtenberger, L. M., Graziani, L. A., Dial, E. J., Butler, B. D., Hills, B. A. (1983). Role of surface-active phospholipids in gastric cytoprotection. *Science*, 219: 1327-1329.

61. Lichtenberger, L. M., Wang, Z. M., Romero, J. J., Ulloa, C., Perez, J. C., Giraud, M. N., Barreto, J. C. (1995). Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) associated with zwitterionic phospholipids: insight into the mechanism and reversal of NSAID- induced gastrointestinal injury. *Nat. Med.*, 1: 154-158.
62. Luega, A., Mourelle, M., Guarner, F., Domingo, A., Salas, A., Malagelada, J. R. (1994). Phosphatidylcholines as mediators of adaptive cytoprotection of the rat duodenum. *Gastroenterology*, 107: 720-727.
63. Barbato, F., La Rotonda, M. I. o. M. C., Quaglia, F. (1997). Interactions of nonsteroidal antiinflammatory drugs with phospholipids: comparison between octanol/buffer partition coefficients and chromatographic indexes on immobilized artificial membranes. *J. Pharm. Sci.*, 86: 225-229.
64. Balon, K., Riebesehl, B. U., Muller, B. W. (1999). Determination of liposome partitioning of ionizable drugs by titration. *J. Pharm. Sci.*, 88: 802-806.
65. Lee, Y. J., Padula, J., Lee, H. K. (1988). Kinetics and mechanisms of etodolac degradation in aqueous solutions. *J. Pharm. Sci.*, 77: 81-86.
66. Lopes, M. S., Pereira, O. G., Alegria, J. P., Gouveia, A. P. M. (2005). Índice Nacional Terapêutico. Tupam Editores, Lisboa.
67. Péhourcq, F., Matoga, M., Jarry, C., Bannwarth, B. (2001). Study of the lipophilicity of arylpropionic non-steroidal anti-inflammatory drugs. A comparison between LC retention data on a polymer-based column and octanol-water partition coefficients. *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.*, 24: 2177-2186.
68. McLaughlin, S. (1973). Salicylates and phospholipid bilayer membranes. *Nature*, 243: 234-236.
69. Castelli, F., Trombetta, D., Tomaino, A., Bonina, F., Romeo, G., Uccella, N., Saija, A. (1997). Dipalmitoylphosphatidylcholine/linoleic acid mixed unilamellar vesicles as model membranes for studies on novel free-radical scavengers. *J. Pharmacol. Toxicol.*, 37: 135-141.

CAPÍTULO 2
PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

CAPÍTULO 2. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Neste capítulo descrevem-se as condições experimentais gerais necessárias para a realização dos diferentes estudos efectuados com lipossomas. As condições experimentais específicas de cada técnica serão descritas nos capítulos a elas respeitantes.

2.1. REAGENTES

Os anti-inflamatórios não esteróides clonixina e etodolac foram gentilmente cedidos pelos laboratórios farmacêuticos Janssen-Cilag e Sofex Farmacêutica, respectivamente. Os outros AINEs (diclofenac, piroxicam, tenoxicam e indoprofeno), a fosfatidilcolina da gema de ovo (EPC), o redutor de Fiske e Subbarrow e o ácido *N*-(2-hidroxietil)piperazina-*N'*-etanessulfónico (hepes) foram adquiridos à Sigma-Aldrich. O dimetilsulfóxido (DMSO) foi adquirido à Fluka. Os reagentes referidos foram utilizados sem qualquer purificação adicional. Os restantes reagentes foram requeridos à Merck e eram de qualidade p. a. (*pro analysi*).

Todas as soluções foram preparadas com água bidesionizada (condutividade menor que $0,1 \mu\text{Scm}^{-1}$).

Os filtros de polycarbonato com 100 nm de diâmetro (Nucleopore) foram obtidos na Whatman.

2.2. PREPARAÇÃO DE LIPOSSOMAS DE EPC

Os lipossomas foram preparados pelo método clássico de hidratação do filme lipídico [1]. A quantidade necessária de EPC, dissolvida em clorofórmio-metanol (9:1), foi evaporada à secura sob corrente de azoto, em rotação permanente e constante de modo a formar um filme de EPC nas paredes do balão de vidro de fundo redondo o

mais fino e homogêneo possível, utilizando um rotavapor da marca Buchi R-200, termostatizado com um banho Buchi B-490. O filme lipídico, assim obtido, foi deixado durante pelo menos três horas sob corrente de azoto, para retirar qualquer vestígio de solvente orgânico. Ultrapassado este intervalo de tempo, o filme foi hidratado com tampão apropriado em quantidade suficiente para originar uma concentração final de aproximadamente 3 mM em EPC (excepto em alguns ensaios de oxidação). Após agitação da mistura em vórtice, foram formados os lipossomas multilamelares (MLVs), os quais foram sujeitos a extrusão para obtenção dos lipossomas unilamelares (LUVs).

A extrusão foi efectuada num extrusor (Lipex Biomembranes Inc.) à temperatura ambiente (superior à temperatura de transição de fase [1, 2]), utilizando uma corrente de azoto a 250 bar. Para a obtenção de LUVs de diâmetro aproximado de 100 nm, a dispersão de MLVs foi sujeita a 10 passagens consecutivas através de filtros de polycarbonato com 100 nm de diâmetro (Nucleopore). A suspensão de lipossomas assim obtida apresentava um aspecto translúcido de tonalidade branco-azulada.

2.3. CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS

As características físicas e químicas dos lipossomas, tais como o tamanho, potencial de membrana e estabilidade, são dependentes da composição e do método utilizado na sua preparação, pelo que é importante proceder à sua caracterização.

2.3.1. Determinação do diâmetro

O diâmetro dos lipossomas, assim como a sua homogeneidade, foi determinado por espectroscopia de correlação fotónica. Segundo este método, os diâmetros são determinados através da medição da dispersão de uma radiação laser incidente, provocada por parte das vesículas em suspensão. Uma vez que estas se encontram em movimento, a dispersão da luz, ao longo do tempo, varia em função do coeficiente de difusão (D) no meio de dispersão. Assim, a intensidade da luz dispersa, ao longo do tempo, varia tão mais rapidamente quanto menores forem as vesículas em suspensão, uma vez que partículas mais pequenas apresentam maiores coeficientes de difusão. Este parâmetro, D , pode ser determinado analisando os sinais

experimentais emitidos a diferentes tempos de amostragem. A partir do valor de D e juntamente com os valores de temperatura (T) e da viscosidade do meio (η), é possível determinar o raio hidrodinâmico (R) das vesículas, através da equação de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{K T}{6\pi \eta R} \quad (2.1)$$

em que K é a constante de Boltzmann e T a temperatura em kelvin (K).

O aparelho utilizado foi um Malvern Zeta Sizer 5000 equipado com uma radiação laser hélio-néon de comprimento de onda de 633 nm como luz incidente, de 5 mW. A representação esquemática do aparelho pode ser observada na Figura 2.1.

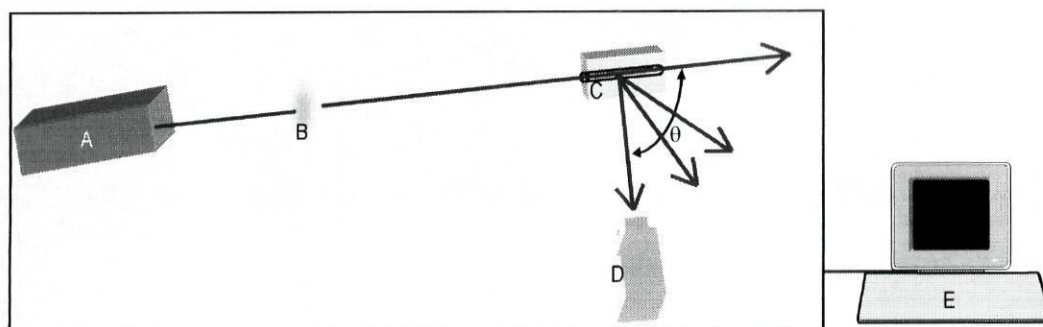


Figura 2.1: Representação esquemática do equipamento usado para a determinação do diâmetro e potencial-zeta dos lipossomas: A - Fonte de raios laser; B - Lente; C - Célula contendo a amostra; D - Fotomultiplicador; E - Computador.

Todas as medidas da luz dispersa 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 interno, submerso num banho de água de temperatura controlada por uma sonda com uma precisão de $0,1^\circ\text{C}$. O valor do índice de refração do meio considerado para os cálculos foi de 1,330 e o valor da viscosidade do meio foi de 0,890 cP. A análise quantitativa da variação da intensidade da luz em função do tempo foi realizada com um correlador 7132 "multi-bit" com 256 canais, cada um recolhendo e analisando dados a diferentes tempos de amostragem.

Devido à sua homogeneidade de tamanhos e à sua esfericidade, os LUVs proporcionam bons resultados com esta técnica de determinação do raio hidrodinâmico de partículas, sendo a espectroscopia de correlação fotónica uma técnica muito difundida para análise deste tipo de vesículas [3].

O tamanho médio dos LUVs preparados por extrusão foi de 133 ± 5 nm (média e desvio padrão), a um valor de pH igual a 7,4 e de 129 ± 7 nm (média e desvio padrão), a um valor de pH igual a 3,0. Cada medida do tamanho das partículas corresponde à média de 10 leituras da mesma amostra. Os resultados mostram que não houve variação do tamanho do diâmetro dos lipossomas nos diferentes valores de pH considerados.

Para além da determinação do tamanho das partículas, foi possível calcular o valor do índice de polidispersão, que é indicativo do grau de heterogeneidade da amostra no que respeita ao tamanho. Assim, quanto maior 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, cujo valor varia entre 0,0 e 1,0. Os valores de polidispersão obtidos com as amostras a um valor de pH igual a 7,4 ou 3,0 foram iguais a 0,09, o que significa que as várias populações de lipossomas preparadas para os diferentes estudos eram muito homogêneas em termos de diâmetro. De facto, uma amostra que apresente uma polidispersão menor que 0,1 é considerada monodispersa [4].

2.3.2. Determinação do potencial-zeta

A determinação do potencial-zeta foi efectuada no mesmo equipamento descrito no estudo do diâmetro (Malvern Zeta Sizer 5000) e fornece informações acerca do potencial de membrana das vesículas lipossómicas. Este estudo baseia-se na medição da mobilidade electroforética das vesículas fosfolipídicas, a partir da qual é possível calcular o valor de potencial-zeta (Figura 2.2), pela equação de Henry:

$$\mu_e = \frac{2\varepsilon \Psi f(\kappa a)}{3\eta} \quad (2.2)$$

onde μ_e é a mobilidade electroforética, Ψ o potencial-zeta, ε a constante dieléctrica, $f(\kappa a)$ a função de Henry e η a viscosidade do meio.

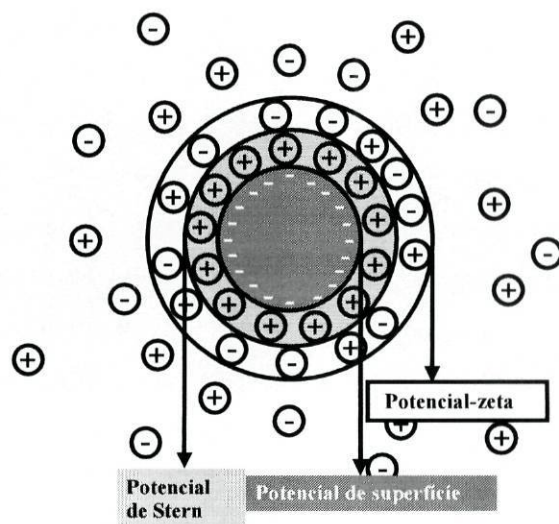


Figura 2.2: Representação esquemática da dupla camada de cargas à superfície de uma partícula aniônica (membrana biológica ou modelos de membrana).

Para a medição da mobilidade electroforética, recorreu-se à utilização da mesma célula descrita na determinação do diâmetro dos lipossomas, que possui dois eléctrodos que criam, pela aplicação de uma voltagem máxima de 400 V, uma diferença de potencial de 80 V/cm, na qual se movimentam as partículas em suspensão (Figura 2.3). A velocidade de deslocamento das partículas nesse campo eléctrico depende da respectiva carga.



Figura 2.3: Representação esquemática de uma célula ZET 5104 usada para a determinação do potencial-zeta de uma amostra de um lipossoma carregado negativamente e dos padrões das barras de interferência.

A medição de potencial-zeta efectuada por este equipamento é baseada no efeito de Doppler ("Laser Doppler Electrophoresis"), ou seja, na alteração da frequência sofrida pela luz dispersa por uma partícula em movimento. Este efeito é usado para medir a velocidade da partícula, mas como a frequência da luz é demasiado elevada (10^{14} Hz), a sua alteração deve ser medida recorrendo-se a uma técnica interferométrica, usando as barras de interferência causadas pelo cruzamento

de dois raios laser oriundos de uma mesma fonte e seguindo trajectos similares. Os dois raios laser perpendiculares cruzam-se num determinado ponto da célula ZET 5104, formando barras de interferência, cujo espaçamento é conhecido. As barras de interferência encontram-se representadas na Figura 2.3.

As partículas em movimento interagem com as barras, causando a dispersão da luz de uma forma que depende da velocidade das partículas. A luz dispersa é medida pelo fotomultiplicador focado para um ponto de confluência dos lasers e a contagem de fótons permite a elaboração de um espectro de frequência a partir do qual a mobilidade e, consequentemente, o potencial-zeta das partículas pode ser calculado.

Um refinamento deste sistema consiste na modulação de um dos raios laser com um espelho oscilante, o que permite fazer oscilar o padrão das barras com uma determinada frequência de modulação (geralmente 1000 Hz). Esta oscilação permite efectuar leituras da velocidade das partículas com maior exactidão e permite, também, a medida do potencial de partículas que apresentam carga nula, não se movendo no campo eléctrico. A eliminação da polarização dos eléctrodos é conseguida por reversão cíclica do sinal do campo eléctrico aplicado e a eliminação do aquecimento da amostra por corte da voltagem eléctrica entre cada ciclo.

Como a própria parede da célula apresenta carga, que origina uma dupla camada idêntica à observada para partículas carregadas, quando a aplicação do campo eléctrico se faz sentir, forma-se uma corrente de iões ao longo do capilar, junto à parede. Como a célula é fechada e o fluido é não compressível, gera-se uma corrente compensatória de sentido contrário no centro do capilar. O perfil das correntes resultante é parabólico, sendo estas correntes adicionadas à velocidade adquirida pela partícula sujeita à electroforese. Nos pontos onde as duas correntes se anulam, esse efeito não se faz sentir, denominando-se esses pontos por camadas estacionárias. As determinações foram efectuadas numa dessas camadas onde a electro-osmose apresentada pelo solvente é igual a zero.

Para a determinação dos valores de potencial-zeta foi necessária a introdução, no programa informático de aquisição e tratamento de resultados, dos valores das seguintes constantes físicas: índice de refração do meio igual a 1,330, viscosidade igual a 0,890 cP e constante dieléctrica igual a 79,0. Todas as medidas foram realizadas à temperatura de $25,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$, correspondendo cada valor obtido à média de 10 valores experimentais.

Na Tabela 2.1 apresentam-se os valores de potencial-zeta de lipossomas de EPC obtidos a valores de pH iguais a 3,0 e 7,4.

Tabela 2.1: Valores do potencial-zeta de lipossomas de EPC a diferentes valores de pH.

pH	Potencial-zeta (mV)
3,0	$15,5 \pm 0,7$
7,4	$-1,4 \pm 0,1$

Como é possível observar na Tabela 2.1, o potencial-zeta das membranas de EPC a um valor de pH igual a 7,4 revelou-se ligeiramente negativo, como o descrito por Kraayenhof *et al.* [5]. A um valor de pH igual a 3,0, o potencial-zeta dos lipossomas de fosfatidilcolina tornou-se positivo devido à protonação do grupo fosfato, adquirindo a molécula carga positiva devido ao grupo colina [6]. O pK_a do grupo fosfato é aproximadamente 2 [7], pelo que a um valor de pH igual a 3,0 a proporção de protonação deste grupo é muito significativa, cerca de 90,9%, apresentando a fosfatidilcolina uma carga positiva.

2.3.3. Verificação da estabilidade

Ao longo do tempo, os lipossomas podem sofrer diversos tipos de alterações, que podem ser divididas em físicas, químicas e biológicas. Fisicamente, os lipossomas podem sofrer agregação, fusão e ruptura membranar, dependendo da constituição lipídica, bem como do meio envolvente. A verificação da estabilidade física dos lipossomas foi efectuada através da avaliação do diâmetro médio das vesículas, ao longo do tempo.

Estudos realizados com diversas amostras de lipossomas (LUVs) guardadas, ao longo de vários dias, a 4°C e a 25°C permitiram verificar que os LUVs são muito estáveis fisicamente: quando mantidos à temperatura de 4°C não apresentaram alteração do diâmetro médio ao fim de 5 dias; quando armazenados à temperatura ambiente apresentaram um aumento de diâmetro médio de 10% ao fim do mesmo tempo.

Quimicamente, os fosfolípidos que constituem os lipossomas podem sofrer dois grandes processos degenerativos: hidrólise e oxidação [1]. A oxidação dos fosfolípidos acontece preferencialmente com os fosfolípidos polinsaturados, como é o caso da fosfatidilcolina. Essa oxidação dá-se, na ausência de oxidantes específicos, via um mecanismo de radicais livres. A presença de oxigénio, luz e temperaturas elevadas intensificam o processo, pelo que foi importante a protecção dos lipossomas contra estes factores. A hidrólise dos fosfolípidos origina lisofosfolípidos e ácidos gordos livres, que parecem possuir a capacidade para interaccionar com a membrana, contribuindo para a sua instabilidade física e aumentando a sua permeabilidade [2]. Além disso, os produtos resultantes das reacções de hidrólise apresentam maior solubilidade em água que os seus precursores fosfolípidicos, promovendo uma aceleração dos processos de degradação posteriores, visto diminuírem o valor do pH do meio. Este processo de degradação química é, assim, fortemente afectado pelo valor de pH do meio e também pela temperatura, enquanto a força iónica parece não ter influência neste processo [2].

A hidrólise dos fosfolípidos ocorre em menor extensão para valores de pH do meio próximos da neutralidade [2], pelo que este processo degradativo pode ser minimizado conservando as suspensões dos lipossomas a baixas temperaturas (4°C) e a um valor de pH igual a 7,4.

2.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE EPC

Devido às perdas de lípido, passíveis de ocorrer durante o processo de preparação dos lipossomas, tornou-se necessário proceder à determinação da concentração final de EPC.

A concentração de EPC foi determinada pelo método do fosfomolibdato modificado [8]. O método referido baseia-se na mineralização do fósforo presente nos fosfolípidos a fosfato inorgânico, usando como agente oxidante o ácido perclórico a 70%. Assim, a 500 µL de amostra devidamente diluída, de forma a apresentar uma concentração igual ou inferior a 250 µM, era adicionado 0,4 mL de ácido perclórico a 70%, em tubos graduados de piróx de fundo cónico. Esta mistura era incubada a 180-200°C durante 1 hora num banho de areia, de modo a ocorrer a mineralização das amostras. Após arrefecimento das amostras à temperatura ambiente, o fosfato era convertido em ácido fosfomolibdico, por adição de uma solução ácida de molibdato de

amónio (4,6 mL, 1,78 mM) e posteriormente reduzido pelo reagente redutor de Fiske & Subbarrow (0,2 mL, de uma solução de 0,8 g de reagente em 5 mL de água bidesionizada), a 100°C durante 7 min, a azul de molibdénio. A intensidade da cor azul das soluções, após arrefecimento à temperatura ambiente, foi, então, medida espectrofotometricamente a 830 nm. A concentração das amostras foi calculada por interpolação numa curva de calibração preparada extemporaneamente e cujos padrões de fosfato monopotássico (KH_2PO_4) com concentrações compreendidas de 0 a 0,3 mM, preparados por diluição de uma solução mais concentrada, sofreram os mesmos procedimentos descritos para as amostras.

2.5. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES CONTENDO AINES

As soluções mais concentradas dos fármacos designadas por “soluções-mãe” foram preparadas por dissolução de uma determinada massa de fármaco em pó no tampão apropriado, em água ou etanol.

As “soluções-mãe” dos fármacos foram filtradas por filtro com 0,45 μm de diâmetro de poro. Posteriormente, as concentrações de fármaco nas soluções filtradas foram determinadas, após diluição adequada, por determinação da absorvância de UV/Vis e interpolação do valor de absorvância obtido numa curva de calibração construída para o efeito. Esta curva de calibração foi feita usando soluções padrão do fármaco em questão, obtidas a partir de diluições de uma solução mais concentrada, que foi preparada por dissolução de uma quantidade, rigorosamente pesada, desse fármaco no mesmo solvente (tampão, água ou etanol).

Por vezes, foram também preparadas “soluções-mãe” dos AINEs piroxicam, tenoxicam e etodolac em tampão suplementado com 1% (V/V) em dimetilsulfóxido (DMSO), quando se pretendia obter uma concentração superior à que é possível obter apenas em tampão. Contudo, mesmo usando este solvente binário, que permitia uma maior solubilização dos fármacos, procedeu-se da forma anteriormente descrita para a determinação da concentração de fármaco. Deve-se, no entanto, referir que a percentagem de DMSO usada não provoca qualquer alteração no comportamento das membranas lipídicas [9].

2.6. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS CONTENDO LIPOSSOMAS E AINES

As amostras constituídas por LUVs e os fármacos em estudo foram preparadas por um método denominado incubação. Neste método de preparação, a suspensão contendo os lipossomas num determinado tampão foi adicionada a uma solução de fármaco no mesmo tampão. Esta suspensão resultante era diluída com o mesmo tampão de forma a obter-se a concentração desejada de fármaco e EPC. Em seguida, era deixada a incubar durante um intervalo de tempo e a um valor de temperatura de acordo com os vários métodos utilizados, ao abrigo da luz, para promover o estabelecimento do equilíbrio de partição fármaco/LUV.

2.7. BIBLIOGRAFIA

1. Lasic, D. D. (1993). *Liposomes - from Physics to Applications*. Elsevier. New York.
2. New, R. R. C. (1990). *Liposomes - a practical approach*. Oxford University Press. New York.
3. Montero, M. T., Carrera, I., Hernández-Borrell, J. (1994). Encapsulation of a quinolone in liposomes. Location and effect on lipid bilayers. *J. Microencapsulation*, 11: 423-430.
4. Martí, A., Armengol, X., Estelrich, J., Hernández-Borrell, J. (1992). Encapsulation of doxorubicin in neutral liposomes by passive methods: evidence of drug-lipid interaction at neutral pH. *J. Microencapsulation*, 9: 191-200.
5. Kraayenhof, R., Sterk, G. J., Sang, H. W. W. F. (1993). Probing biomembrane interfacial potential and pH profiles with a new type of float-like fluorophores positioned at varying distance from the membrane surface. *Biochemistry*, 32: 10057-10066.
6. Kraayenhof, R., Sterk, G. J., Sang, H. W. W. F., Krab, K., Epand, R. M. (1996). Monovalent cations differentially affect membrane surface properties and membrane curvature, as revealed by fluorescent probes and dynamic light scattering. *Biochem. Biophys. Acta*, 1282: 293-302.
7. Pauletti, G. M., Wunderli-Allenspach, H. (1994). Partition coefficients in vitro: artificial membranes as a standardized distribution model. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 1: 273-282.
8. McClare, C. W. F. (1971). An accurate and convenient organic phosphorus assay. *Anal. Biochem.*, 39: 527-530.
9. Kiselev, M. A., Lesieur, P., Kisilev, A. M., Gabrielle-Madelmond, C., Ollivon, M. (1999). DMSO-induced dehydration of DPPC membranes studied by X-ray diffraction, small-angle neutron scattering, and calorimetry. *J. Alloys Compd.*, 286: 195-202.

CAPÍTULO 3

**AVALIAÇÃO DA INTERACÇÃO DE ANTI-INFLAMATÓRIOS
NÃO ESTERÓIDES COM LIPOSSOMAS**

CAPÍTULO 3. AVALIAÇÃO DA INTERACÇÃO DE ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTERÓIDES COM LIPOSSOMAS

3.1. INTRODUÇÃO

Os anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) são os fármacos mais usados na terapêutica para o tratamento de doenças que evoluem com dor, febre e inflamação. Este grupo de fármacos, quimicamente heterogéneo, apresenta como principal mecanismo de acção a inibição da síntese de prostaglandinas, pela inibição da enzima ciclooxigenase (COX) [1, 2]. No entanto, este ponto de vista, geralmente aceite, tem sido posto em causa, devido à contínua descoberta de que os AINEs afectam uma vasta variedade de processos celulares, os quais também possuem crucial importância para as suas acções terapêuticas e efeitos secundários indesejáveis. De facto, embora o reconhecimento da acção diferencial de novos e estabelecidos AINEs na actividade da ciclooxigenase afectando a produção de prostaglandinas inflamatórias (pela COX-2) e aquelas que são fisiologicamente importantes (pela COX-1) possa ser significativo para os processos inflamatórios e fisiológicos dependentes desses mediadores, tem sido verificado que as doses necessárias para inibir a reacção inflamatória são maiores que as precisas para causar a inibição da síntese das prostaglandinas. Assim, os AINEs parecem também exercer a sua acção anti-inflamatória por outros mecanismos complementares não menos importantes [3, 4]. Essa variedade de funções incluiu, por exemplo, modificações da actividade de outras enzimas membranares como a lipoxigenase, das funções celulares membranares, na libertação de enzimas lisossomais, na agregação e adesão dos neutrófilos, na fluidez da membrana, assim como, a inibição da fosforilação oxidativa na mitocôndria e também a inibição da geração ou a captação de espécies reactivas de oxigénio (como anião superóxido, radical hidroxilo, peróxido de hidrogénio e ácido

hipocloroso) [5-9]. Adicionalmente, os AINEs mostraram ser capazes de inibir a proliferação celular, de alterar a regulação do ciclo celular e de induzir a apoptose em linhas celulares cancerígenas, por um mecanismo independente da inibição da síntese das prostaglandinas [5]. Assim, apesar das acções terapêuticas e tóxicas dos AINEs ainda não estarem completamente estabelecidas há, no entanto, uma evidência consensual de que a respectiva afinidade lipídica é de maior importância para explicar o mecanismo de acção dos fármacos. De facto, dependendo do seu carácter hidrolipofílico, os AINEs podem estar distribuídos, em maior ou menor extensão, entre as fases membranas e aquosa. Essa distribuição condiciona a concentração dos mesmos em cada fase e controla a sua penetração no interior da membrana e/ou as interacções com os fosfolípidos ou com outros componentes membranares, como a enzima COX [10]. Assim, a determinação das interacções fármaco/membranas biológicas e a medição de algumas propriedades físico-químicas, tais como as constantes de acidez e hidrofobicidade, são passos fundamentais no que respeita à avaliação da eficácia destes fármacos. Contudo, é necessário ter sempre presente que o modo de acção de um fármaco depende da sua estrutura química e das suas propriedades físico-químicas, as quais lhe conferem a capacidade de interagir com sistemas biológicos, como receptores, proteínas, membrana celular, entre outros. Com efeito, seria de prever que moléculas estruturalmente semelhantes apresentassem eficácias terapêuticas idênticas. No entanto, apesar de intrigante, esta relação nem sempre se verifica, uma vez que diversos graus de toxicidade e actividade anti-inflamatória ocorrem não apenas entre compostos estruturalmente não relacionados, como também dentro de uma mesma classe química de AINEs [11, 12].

Para os AINEs poderem exercer o seu efeito terapêutico, necessitam de passar variadas barreiras lipídicas, formadas pelas membranas celulares, e atingir o local alvo numa concentração suficiente que permita a actividade biológica. De facto, resultados obtidos em diversos estudos permitem apontar para a hipótese de que a interacção não específica de certos fármacos com a membrana faz parte do seu processo de acção. Neste contexto, a membrana celular, de composição fosfolipídica, é um sistema de particular importância para a acção farmacológica, uma vez que os parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos estão, de uma forma geral, dependentes da capacidade de interacção de um fármaco com esta estrutura. Assim, para o conhecimento do mecanismo de acção e dos efeitos adversos dos AINEs constitui grande importância o estudo da interacção destes fármacos com as biomembranas.

A complexidade, o número e diversidade de factores envolvidos e operantes num mesmo fenómeno que ocorre na membrana celular, faz com que os estudos físico-químicos nem sempre possam ser facilmente compreendidos e realizados *in vivo*, usando sistemas celulares. Desta forma, e numa primeira fase, podem utilizar-se sistemas *in vitro*, que simulem pequenas partes desses sistemas complexos. A partir da informação retirada com estes sistemas podem usar-se sistemas de maior complexidade, numa contínua aproximação dos sistemas biológicos reais, de forma a obter dados que possam ser extrapolados para situações *in vivo*.

O conhecimento químico das estruturas membranares tem permitido, de uma forma progressiva, desenvolver e aperfeiçoar modelos cada vez mais harmonizados com as funções de mimetização dos processos mediados pelas membranas. Dos diversos modelos de biomembranas desenvolvidos, os lipossomas foram as estruturas que mostraram ser mais adequadas e que melhor ilustravam a interacção dos fármacos com as membranas celulares. Para além disso, o seu manuseamento é mais fácil e mais reprodutível do que a utilização de células ou tecidos animais, já que os lipossomas podem ser fácil e homogeneamente preparados, e as suas propriedades físicas bem caracterizadas. Assim, neste estudo utilizou-se lipossomas unilamelares (LUVs) de fosfatidilcolina da gema de ovo (EPC) como modelos das biomembranas. Adicionalmente, sendo os LUVs referidos constituídos por lípidos naturais apresentam o ambiente químico e anisotrópico observado nas membranas que pretendem mimetizar.

Neste trabalho, o estudo da interacção dos AINEs com os lipossomas compreendeu quer a quantificação dessa interacção, quer o conhecimento da localização dos mesmos nas membranas. Para além destes aspectos fundamentais para a compreensão do mecanismo de acção destes fármacos, outros, não menos importantes, avaliaram os efeitos resultantes dessa interacção nas propriedades físico-químicas das membranas lipídicas, nomeadamente no potencial e na fluidez da membrana.

A extensão da interacção do fármaco com a membrana lipídica foi quantificada pelo coeficiente de partição lipossoma/solução aquosa (K_p) [13-15]. O coeficiente de partição de um soluto é definido como a razão, no equilíbrio, entre as concentrações do soluto em duas fases imiscíveis por entre as quais o soluto pode partilhar [16]. Contudo, a IUPAC define o coeficiente de partição em termos de actividades e a correspondência para concentrações é denominada por razão de partição, mas dada a

prática comum na literatura do termo coeficiente de partição adoptou-se esta nomenclatura nesta dissertação.

A determinação do valor do coeficiente de partição, como anteriormente referido, é fundamental para o discernimento da farmacocinética e farmacodinâmica dos fármacos. Com efeito, valores de K_p elevados ($> 10^3$) aumentam a probabilidade de o fármaco interagir com o receptor por uma via transmembranar ou a possibilidade de penetrar a uma profundidade adequada na membrana lipídica, de modo a que se possa difundir até ao local activo.

Tradicionalmente é usado o coeficiente de partição octanol/água ($K_{o/a}$) como medida da hidrofobicidade dos compostos. No entanto, o sistema octanol/água apenas constitui um bom modelo para a determinação da interacção fármaco/membrana quando as interacções polares entre o soluto e a bicamada lipídica são mínimas ou inexistentes. De facto, enquanto que para fármacos relativamente hidrofóbicos este modelo mimetiza razoavelmente a partição solvente/membrana, para substâncias com grupos polares nem sempre se obtém uma boa correlação. Isto porque as membranas biológicas, constituídas por uma bicamada de fosfolípidos, apresentam uma zona interna de natureza apolar e duas zonas externas de natureza polar, pelo que as interacções das membranas com os fármacos são mais complexas do que é sugerido pelo modelo simplista de cálculo do $K_{o/a}$. Por esta razão, tornou-se necessário o desenvolvimento de métodos alternativos para a caracterização de fármacos capazes de estabelecer interacções electrostáticas com os grupos polares das membranas, uma vez que o octanol, como referido, apenas serve de modelo para interacções apolares [17]. Deste modo, a determinação do coeficiente de partição lipossoma/solução aquosa fornece indicações mais fiáveis sobre o grau de interacção de um fármaco com as biomembranas, sendo estes modelos biomiméticos capazes de mimetizar os variados ambientes membranares, desde a superfície polarizada até ao seu interior lipofílico. Do mesmo modo, os lipossomas mimetizam as interacções iónicas, dipolo-dipolo, hidrofóbicas e as ligações de hidrogénio, que definem a partição nas verdadeiras biomembranas [18, 19]. Por outro lado, o facto do octanol ser relativamente tóxico e poluidor (duas vertentes opostas à ideia de química verde) ditam a sua cada vez maior inaplicabilidade neste tipo de estudos.

Neste trabalho, o K_p foi determinado por diferentes técnicas experimentais, nomeadamente por espectrofotometria derivativa de ultravioleta/visível (UV/Vis), pela determinação do potencial-zeta e por desactivação de fluorescência. A determinação do coeficiente de partição por estas diferentes metodologias baseou-se na avaliação

de modificações nas propriedades de um dos diferentes componentes do sistema, devido à interacção do AINE com a membrana lipídica. Assim, enquanto a espectrofotometria derivativa se baseou na variação das propriedades do fármaco, a determinação do potencial-zeta avaliou a modificação da carga superficial da membrana e, finalmente, a desactivação de fluorescência teve por base a variação das propriedades de uma terceira molécula incorporada no sistema, designadamente de uma sonda de fluorescência. Pelo referido, é possível concluir que a alteração de apenas uma das propriedades físico-químicas de um dos componentes do sistema em equilíbrio ou de uma terceira molécula que se adicione a esse, ou ainda à sua globalidade (como variações das propriedades termoquímicas) é suficiente para se poder proceder à determinação do coeficiente de partição.

Os métodos utilizados neste trabalho não recorrem a técnicas de separação de fases, como filtração, centrifugação e diálise, sendo o K_p determinado directamente nas suspensões, nas quais o fármaco na membrana se encontra em equilíbrio com o fármaco livre em solução. Deste modo, estes métodos, relativamente aos que determinam a concentração do soluto numa e noutra fase isoladas, têm a vantagem de permitir efectuar as medidas sem interferência nos equilíbrios estabelecidos.

A determinação do coeficiente de partição de um AINE entre as pseudo-fases aquosa e lipídica por espectrofotometria derivativa UV/Vis baseia-se na variação das características espectrais do fármaco, quando este se encontra em meios com polaridades diferentes. Essas variações podem manifestar-se tanto em alterações da absorvidade molar (ϵ) como no comprimento de onda máximo de absorção ($\lambda_{\max}$) [14]. Neste estudo, esta metodologia foi utilizada para determinar o coeficiente de partição lipossoma/solução aquosa dos anti-inflamatórios diclofenac, clonixina, piroxicam, tenoxicam, etodolac e indoprofeno, a um valor de pH igual a 7,4 e dos AINEs clonixina e diclofenac a valores de pH iguais a 3,0 e 10,3. Adicionalmente, a espectrofotometria derivativa de UV/Vis foi utilizada na quantificação da interacção entre a clonixina e o diclofenac e lipossomas de EPC contendo na sua constituição colesterol em diferentes proporções (aproximadamente 10 e 40%), a um valor de pH igual a 7,4.

A utilização de diferentes valores de pH permitiu proporcionar condições para que diferentes proporções das formas carregadas ou neutras dos fármacos se encontrassem em equilíbrio. De facto, a caracterização química dos equilíbrios que se estabelecem, quer de ionização, quer de partição, constitui uma importante informação em estudos sobre o modo de acção e biodistribuição dos fármacos. Por outro lado, como as interacções dos fármacos com as biomembranas dependem da composição

química das próprias membranas, além das propriedades físico-químicas dos fármacos, pode-se preparar lipossomas introduzindo na sua estrutura diferentes constituintes para além dos fosfolípidos, nomeadamente colesterol ou mesmo enzimas membranares. Os lipossomas, assim preparados, constituem sistemas de maior complexidade, numa contínua aproximação dos sistemas biológicos reais e permitem o estudo de como determinado constituinte presente nas biomembranas afecta a partição dos fármacos. Neste contexto, incluiu-se nos lipossomas de EPC, constituídos por fosfolípidos naturais, colesterol para analisar a influência deste componente natural na partilha dos AINEs diclofenac e clonixina.

O papel do colesterol nas membranas é bem conhecido: aumenta a ordem lipídica acima da temperatura de transição de fase gel-sólido/cristal-líquido e reduz a ordem lipídica para valores inferiores a esse mesmo valor de temperatura. Portanto, o colesterol é conhecido como um modelador da fluidez, pois, como referido, exerce uma pequena acção fluidificante quando as moléculas se encontram no estado de gel-sólido e, pelo contrário, um efeito marcado no aumento da organização molecular quando se encontram no estado de cristal-líquido. Com efeito, o aumento da concentração de colesterol nas bicamadas provoca um alargamento gradual do intervalo de temperaturas a que ocorre a transição de fase ou o seu desaparecimento quando a razão molar colesterol/fosfolípido é de 50% [18, 20]. O colesterol reduz, consideravelmente, a permeabilidade das bicamadas fosfolipídicas que se apresentam fluidas à temperatura ambiente, aumentando, adicionalmente, a sua estabilidade e diminuindo a mobilidade das moléculas presentes. De facto, o colesterol é, por vezes, usado para reduzir a difusão dos fármacos hidrossolúveis para o exterior das vesículas transportadoras desses, bem como para aumentar a estabilidade desses transportadores na corrente sanguínea [18]. Com efeito, devido às propriedades demonstradas pelo colesterol presente nas membranas, praticamente todas as membranas artificiais contêm colesterol numa concentração até 50%. Encontra-se descrito que com aproximadamente 50% de colesterol, a membrana encontra-se saturada e com percentagens molares superiores torna-se instável [18]. Assim, neste estudo, avaliou-se a interacção dos fármacos clonixina e diclofenac com lipossomas unilamelares de EPC possuindo na sua constituição aproximadamente 10 ou 40% de colesterol.

A interacção de fármacos com os lipossomas de EPC foi também avaliada pela determinação do potencial de membrana, aquando da partição de espécies carregadas, a um valor de pH igual a 7,4 [21]. Deste modo, esta metodologia além de

possibilitar a caracterização das propriedades electrostáticas da membrana induzidas pela partição de um fármaco possuidor de carga na membrana, que, como será descrito posteriormente, constitui um parâmetro fundamental dada a relevância biológica das propriedades de superfície da bicamada lipídica, permite também a quantificação dessa interacção.

A interacção de moléculas de fármaco carregadas com as membranas celulares altera o potencial de superfície da membrana, o qual, por sua vez, também controla a partição dos fármacos [21, 22]. Como resultado, um aspecto importante no estudo da actividade de um fármaco possuidor de carga, como a maioria dos AINEs, é a influência da sua concentração no potencial de superfície da membrana, uma vez que para baixas concentrações este efeito é praticamente insignificante e pode ser negligenciado, mas para concentrações elevadas a sua partição na membrana é marcadamente afectada pelo potencial de superfície. Por este motivo, é crucial a quantificação do efeito dos AINEs no potencial de superfície membranar. Esta metodologia foi utilizada para determinar o coeficiente de partição lipossoma/solução aquosa dos anti-inflamatórios diclofenac e clonixina, uma vez que os valores de potencial-zeta determinados são relacionáveis com a concentração de fármaco na interface membrana/solução aquosa. Consequentemente, os coeficientes de partição, calculados a partir dos valores do potencial-zeta, têm por base a concentração das moléculas na interface, enquanto que as outras técnicas, aqui referidas para a determinação deste mesmo parâmetro, baseiam-se na concentração do composto no seio da solução. Deste modo, a comparação dos resultados fornecidos pelas diferentes metodologias permite verificar se os dados de partida considerados (concentração dos compostos na interface ou no seio da solução) influenciam significativamente os valores de K_p , ou seja, se os resultados assim obtidos são ou não concordantes.

Finalmente, a caracterização quantitativa da interacção fármaco/membrana foi efectuada com base na desactivação de fluorescência de uma sonda exógena. Nesta metodologia, a incorporação no sistema de uma molécula lipofílica, que apresenta uma elevada intensidade de fluorescência no meio lipídico e nula no meio aquoso, permite, no caso de haver uma diminuição da intensidade de fluorescência da molécula fluorescente (fluoróforo) provocada pelo fármaco em análise, quantificar o fármaco presente no meio lipídico. Assim, neste trabalho, para a determinação do K_p dos AINEs diclofenac, clonixina, piroxicam e tenoxicam, a um valor de pH igual a 7,4,

utilizou-se uma sonda da série *n*-AS (ácido *n*-(9-antroliloxi)-esteárico; *n* = 2 ou 12), as quais têm sido extensamente utilizadas para a determinação deste parâmetro [15, 23].

A desactivação de fluorescência foi ainda utilizada para fornecer indicações acerca da localização do fármaco na membrana. De facto, como a desactivação de fluorescência apresenta uma boa razão sinal/ruído, tem sido considerada a técnica de eleição para a quantificação e localização de compostos em sistemas membranares. Adicionalmente, é uma das técnicas mais promissoras nas áreas da química, biologia e medicina. As principais razões da sua expansão resultam da elevada sensibilidade, permitindo o estudo de amostras *in vivo* e *in vitro* em condições biológicas naturais.

O conhecimento da localização membranar dos fármacos e a sua orientação possui grande importância, especialmente quando estes actuam directamente nas membranas ou interactivam com moléculas aí localizadas, tais como receptores ou enzimas, como é o caso dos AINEs. Este estudo permite, assim, um conhecimento mais aprofundado do modo de acção dos fármacos, contribuindo para o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas mais potentes, mais selectivas e detentoras de menos efeitos secundários.

Neste estudo utilizou-se um dos métodos indirectos mais usados para inferir acerca da localização de um soluto em modelos membranares, membranas naturais e células. Com efeito, o estudo da localização membranar pode efectuar-se, fundamentalmente, através de dois tipos de métodos distintos: directos e indirectos. Nos métodos directos a localização é avaliada por técnicas como difracção de raios-X, RMN, entre outros, enquanto que nos métodos indirectos mede-se uma determinada propriedade que, depois, é relacionada com a localização dos solutos, por exemplo, as propriedades de sondas de localização membranar rigorosamente conhecida, cuja alteração por acção do fármaco permite inferir acerca da localização deste na membrana.

A utilização de uma série de sondas estruturalmente semelhante, contendo o mesmo grupo fluorescente ligado a diferentes posições de um esqueleto hidrocarbonado, permite ainda, por comparação da eficácia de desactivação da fluorescência obtida para cada uma das sondas, concluir acerca de quão profundamente se situa o fármaco na bicamada. Assim, no estudo de localização dos AINEs diclofenac, clonixina, tenoxicam, piroxicam, etodolac e indoprofeno, a um valor de pH igual a 7,4, foram usadas sondas da série *n*-AS (*n* = 2, 6, 9 e 12) (Figura 3.1). Na Figura 3.1 é possível observar que as sondas *n*-AS (a cinza claro) inserem-se na membrana com a cadeia estearoil paralela às cadeias de fosfolípidos (representadas a

cinza escuro) e o grupo 9-antioiloxi perpendicular ao plano da membrana, localizando-se na sonda 2-AS perto da parte polar da bicamada (a uma distância de 16,8 Å do centro da bicamada lipídica), na 12-AS mais profundamente (a uma distância de 7,5 Å do centro da bicamada lipídica) e nas restantes sondas em posição intermédia [24].

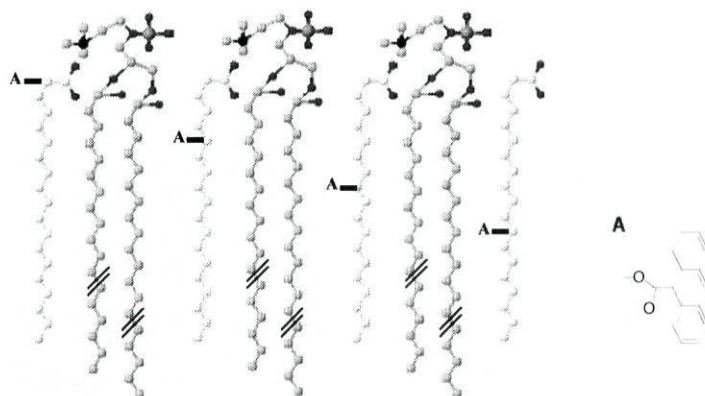


Figura 3.1: Estrutura química das sondas n -AS ($n = 2, 6, 9$ e 12) e sua localização na membrana. (A) corresponde ao grupo 9-antioiloxi.

Para além de estudos de partição e localização, é ainda fundamental, como referido anteriormente, que a interacção dos fármacos com as membranas seja avaliada pela determinação do potencial de membrana [21]. De facto, as membranas celulares apresentam carga, devido à presença de componentes ionizados (como lípidos, glicolípidos e glicoproteínas) na sua constituição e pela ligação ou adsorção de moléculas carregadas à sua superfície. A interacção dos fármacos com as membranas e a consequente alteração do potencial de superfície resultante pode afectar diversos processos regulatórios, nomeadamente a condução de estímulos eléctricos, fenómenos de permeabilidade iónica, de interacção membrana, de ligação de solutos, ou alteração da actividade de enzimas membranares, como a fosfolípase A_2 e da integridade estrutural dos componentes da membrana [10, 25-28]. Estas alterações podem trazer consequências a nível da acção dos fármacos, podendo explicar, pelo menos parcialmente, os seus efeitos a nível da fisiologia da dor e da inflamação. De facto, segundo diversos autores o mecanismo de acção de anestésicos locais parece estar relacionado com a alteração da permeabilidade da membrana [29, 30] e efeitos na condutância de iões em membranas foram também encontrados em estudos com

anti-inflamatórios [31, 32]. Adicionalmente, tem sido referido que um dos eventuais factores provocadores de lesões a nível do estômago pelos AINEs está relacionado com a falha na integridade estrutural, provocada pela alteração da intensidade ou da carga superficial dos fosfolípidos protectores da mucosa gástrica [33, 34]. Pode-se, assim, compreender que as alterações da carga, consequentes da interacção do fármaco com a membrana, poderão conduzir à inibição de determinados processos referentes à sua actividade terapêutica e à indução de outros, como os efeitos colaterais. Neste contexto, além da determinação do potencial-zeta permitir a quantificação da concentração na interface de fármacos possuidores de carga ligados à membrana, como referido anteriormente, também possibilita a caracterização das propriedades electrostáticas membranares induzidas por essa interacção. Assim, o efeito dos AINEs diclofenac, clonixina, piroxicam, tenoxicam, etodolac e indoprofeno nas propriedades electrostáticas de lipossomas foi determinado por estudos de microelectroforese, a partir dos quais é possível o cálculo do potencial-zeta, a um valor de pH igual a 7,4. Adicionalmente, os valores de potencial-zeta dos lipossomas de EPC foram também determinados a um valor de pH igual a 3,0, na presença de concentrações crescentes de clonixina e diclofenac para avaliar a alteração da carga na membrana que poderia ocorrer, por exemplo, ao nível da mucosa gástrica.

Uma primeira abordagem para o estabelecimento de possíveis contribuições electrostáticas da interacção de fármacos com lipossomas pode, no entanto, ser fornecida pela combinação do coeficiente de partição e constantes de acidez (Figura 3.2).

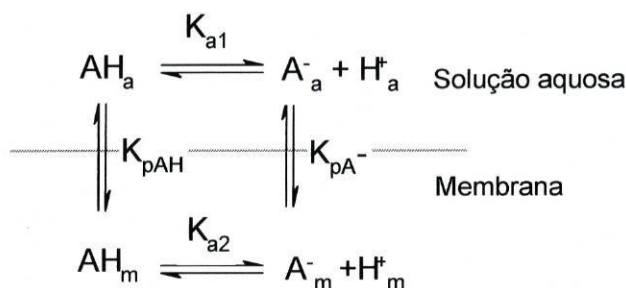


Figura 3.2: Esquema da partição membrana/solução aquosa de um fármaco com características de ácido fraco (AH). AH representa a forma neutra e A⁻ a forma desprotonada do composto, cada uma com o seu coeficiente de partição específico (K_{pAH} e K_{pA⁻}, respectivamente). Os subscritos a e m indicam as espécies na solução aquosa e na membrana e K_{a1} e K_{a2} as constantes de acidez do composto AH na fase aquosa e lipídica.

O conhecimento das propriedades ácido-base e da hidrofobicidade dos fármacos permitem, então, prognosticar o efeito da partição destes nas propriedades eléctricas da bicamada fosfolipídica e, consequentemente, contribuem para uma melhor compreensão do seu mecanismo de acção e efeitos adversos. Deste modo, e uma vez que pouco tem sido descrito sobre o comportamento ácido-base e lipofilia da clonixina, foram determinadas as suas constantes de acidez. A constante de acidez do diclofenac foi também determinada nas mesmas condições experimentais.

Na literatura estão descritos vários processos para a determinação das constantes de acidez, como a espectrofotometria UV/Vis, potenciometria, fluorimetria e calorimetria. Destes, os mais comumente utilizados são os dois métodos primeiramente referidos, devido a serem facilmente exequíveis. Assim, neste trabalho a determinação das constantes de acidez foi realizada por espectrofotometria de UV/Vis, escolha que foi condicionada pelo sistema em estudo, designadamente pelas propriedades químicas das substâncias que os constituem (solubilidade e alteração do espectro de absorção em função do valor de pH).

Para além dos aspectos químicos da interacção dos fármacos com as membranas biológicas, é também necessário atender aos aspectos físicos dessa interacção. As membranas biológicas exibem uma estrutura global comum, altamente dinâmica e fluida, a qual permite a preservação de todas as suas funções biológicas. Os lípidos nas membranas das células à temperatura corporal estão no estado de cristal-líquido, que é um estado parcialmente ordenado, mas ao mesmo tempo flexível que permite movimentos aos seus componentes. A microviscosidade em cada folheto da bicamada lipídica pode assim determinar o grau de penetração de solutos e a taxa de difusão lateral de proteínas da membrana. Por conseguinte, a região hidrocarbonada da bicamada lipídica pode ter um papel signficante na determinação de interacções proteína-lípido, além de constituir a matriz hidrofóbica na qual as proteínas de membrana se inserem. Portanto, qualquer modificação da estrutura lipídica da membrana alterará as propriedades membranares e poderá afectar o funcionamento da célula. Os fármacos capazes de provocar alterações na fluidez membranares poderão ser responsáveis por mudanças nas propriedades catalíticas observadas em enzimas membranares, por alterações da actividade dos receptores ligados à membrana e da permeabilidade dos canais de iões responsáveis pela homeostasia das células [6]. Adicionalmente, tem sido sugerida uma relação entre a capacidade dos fármacos em alterarem a fluidez da membrana e a sua actividade antioxidante [35-37].

A estrutura da membrana parece, então, ser importante não só para as características de permeabilidade da membrana e interacção de moléculas exógenas, como também para a acção de moléculas endógenas acopladas à membrana (proteínas, receptores, canais) e nos mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos farmacológicos exibidos por uma variedade de fármacos. Neste contexto, os estudos de fluidez da membrana mostraram ser importantes para o esclarecimento quer de mecanismos biológicos, quer de condições patológicas, como inflamação crónica, cancro e doenças cardiovasculares [6-8, 35, 38-40].

A fluidez da membrana pode ser avaliada por diferentes métodos, como calorimetria diferencial de varrimento, anisotropia de fluorescência, polarização generalizada de Laurdan e estudos de perda da carboxifluoresceína. No entanto, a técnica mais largamente utilizada é a anisotropia de fluorescência de estado estacionário, uma vez que associada à sua fácil execução está uma grande sensibilidade. De facto, existem numerosos estudos, na literatura científica, acerca da influência dos fármacos na fluidez membranar por determinações de anisotropia de fluorescência [41-43].

A anisotropia de fluorescência fundamenta-se na determinação do grau e da extensão da rotação difusional do fluoróforo (sonda) durante o tempo de vida do estado excitado. Pequenas alterações na rigidez da matriz envolvente da sonda produzem alterações no movimento rotacional da sonda e, como tal, provocam alterações na anisotropia. Assim, uma vez que a anisotropia de fluorescência de estado estacionário mostrou ser útil na monitorização das alterações estruturais nas biomembranas, foi utilizada neste estudo para avaliar os efeitos dos fármacos na fluidez da bicamada lipídica de LUVs de EPC, usando uma série de sondas *n*-AS ($n = 2, 6, 9$ e 12). Com efeito, as sondas *n*-AS têm sido largamente utilizadas nos estudos de avaliação da fluidez da membrana em modelos membranares ou biomembranas [44]. Complementarmente, esta série de sondas, como possui o mesmo grupo fluorescente posicionado a diferentes profundidades da bicamada (Figura 3.1), possibilita o estudo do “gradiente de fluidez” da membrana. No entanto, apesar desta técnica ter-se mostrado uma ferramenta valiosa no estudo das propriedades físicas das membranas, é necessário considerar correcções apropriadas aos dados experimentais, devendo as medidas de anisotropia ser corrigidas para a variação do tempo de vida do estado excitado do fluoróforo, para evitar interpretações ambíguas.

3.2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.2.1. Determinação das constantes de acidez por espectrofotometria UV/Vis

A determinação espectrofotométrica das constantes de acidez é um método que se baseia na observação das mudanças espectrais devidas à protonação/desprotonação de uma molécula. No entanto, para que possam ser visualizadas essas alterações nos espectros de absorção, é necessário que ao local onde ocorra a perda ou ganho de H^+ (catião de hidrogénio) se encontre associado um grupo cromóforo. Caso isto não aconteça, o espectro de absorção da molécula não variará com o valor de pH e, deste modo, esta técnica não poderá ser utilizada para a determinação das constantes de acidez da molécula em questão. Contudo, ultrapassada esta limitação, a espectrofotometria UV/Vis é o método mais comumente utilizado para a determinação das constantes de acidez de substâncias pouco solúveis em água e quando os valores dessas constantes são particularmente altos ou baixos, isto é, menores que 2 ou maiores que 11 [45].

O espectro de absorção obtido perto do valor de pK_a corresponde à soma das contribuições das formas protonadas e desprotonadas, se a concentração de composto usada se encontrar dentro dos limites de concentrações onde a lei de Lambert-Beer se verificar. Portanto, as variações espectrais vão permitir calcular a razão das concentrações entre as formas protonada e desprotonada dos compostos, devendo as determinações ser efectuadas num intervalo superior a 4 unidades de pH em torno do valor de pK_a [46]. Deve-se, no entanto, referir que as constantes de acidez calculadas referem-se a constantes de equilíbrio estequiométricas. De acordo com as recomendações propostas pela IUPAC, é usual a determinação de constantes de equilíbrio estequiométricas num meio iónico inerte cujo electrólito de suporte possui uma concentração superior, de pelo menos cem vezes, às das espécies em estudo, visto que a maior parte das reacções de equilíbrio com interesse prático, seja na área biológica ou noutra, como por exemplo, na alimentar ou na ambiental, ocorrem na presença de uma determinada quantidade fixa de electrólitos inertes [47-49].

O cálculo das constantes de equilíbrio a partir de dados espectrofotométricos baseia-se na seguinte equação [50]:

$$Abs_{\lambda} = l \left(\sum \epsilon_{\lambda x} C_x \right) \quad (3.1)$$

onde l é o percurso óptico, $\epsilon_{\lambda x}$ a absorvidade molar da espécie x ao comprimento de onda λ , C_x a sua concentração e Abs_{λ} a absorvância ao mesmo comprimento de onda. Esta equação não é mais do que a lei de Lambert-Beer generalizada.

A relação entre a constante de acidez e os valores de absorvância do sistema pode ser traduzida por:

$$pK_a = pH - \log \frac{Abs_1 - Abs_2}{Abs_3 - Abs_1} \quad (3.2)$$

onde Abs_1 é a absorvância em condições de pH próximas do valor de pK_a , Abs_2 refere-se à absorvância da forma protonada e Abs_3 à da forma desprotonada [51]. A relação definida pela equação 3.2 permite a transformação linear da função $Abs = f(-\log [H^+])$ e, consequentemente, permite o cálculo da constante de acidez de um sistema simples. Este e outros métodos de regressão linear são frequentemente usados na obtenção de valores de pK_a por espectrofotometria de ultravioleta/visível, mas acabam, geralmente, por ser ultrapassados pelos métodos de regressão não linear, como o utilizado no programa de cálculo pHab usado neste trabalho [50].

3.2.2. Determinação do coeficiente de partição

3.2.2.1. Espectrofotometria derivativa

A determinação do K_p usando a espectrofotometria derivativa baseia-se na variação das características espectrais (absortividade molar, ϵ , e/ou comprimento de onda de absorção máximo, $\lambda_{máx}$) do fármaco, quando este se localiza em meios com características polares distintas [14]. O recurso à espectrofotometria UV/Vis apresenta bastantes vantagens, pois não só a maioria dos compostos possui propriedades espectroscópicas facilmente mensuráveis, que dependem da natureza química do meio e são proporcionais à concentração do composto em cada uma das fases, como por outro lado, a sua sensibilidade permite o uso de concentrações semelhantes às encontradas em sistemas naturais. Contudo, a presença de microestruturas

(lipossomas) de tamanhos não negligenciáveis causa dispersão da luz, principalmente a comprimentos de onda inferiores a 300 nm, traduzida pelo aumento da linha de base do espectro de absorção. Este aumento da absorvância é apenas aparente, pois é resultado da diminuição da quantidade de luz que atinge o detector. A dispersão de luz é um problema comum em análise espectrofotométrica de amostras farmacêuticas e biológicas e pode ser de dois tipos [52]: dispersão de Rayleigh, que ocorre quando as partículas são pequenas comparativamente ao comprimento de onda (λ) e que é inversamente proporcional à quarta potência de λ , e dispersão de Tyndall, que ocorre quando as partículas são grandes e que é inversamente proporcional ao quadrado de λ .

Estas interferências espectroscópicas, bem como a absorvância das próprias microestruturas, dificultam grandemente a análise das variações da absorvância do soluto. A subtracção de um branco é sempre uma primeira operação para reduzir este efeito, no entanto, normalmente, não oferece resultados satisfatórios. De facto, as interferências espectrais só são diminuídas ou mesmo anuladas após a derivação dos espectros de absorção registados. Neste contexto, a espectrofotometria derivativa permite a eliminação de interferências causadas pelos sistemas organizados, difíceis de anular em espectrofotometria de ordem zero, sem a necessidade de se recorrer a técnicas de separação de fases, que podem conduzir à alteração do equilíbrio estabelecido pelo soluto entre os dois meios "imiscíveis". Com efeito, dos métodos desenvolvidos para eliminar a perturbação causada pela dispersão de luz sem recorrer a técnicas de separação, a espectrofotometria derivativa é um dos mais eficientes e de mais fácil aplicação [52]. Assim, existem numerosos exemplos de utilização desta técnica analítica na literatura [13-16, 21, 53-55].

A espectrofotometria derivativa possibilita uma melhor resolução dos sinais espectrais por diminuição da largura das bandas, evidenciando detalhes espectrais e facilitando a determinação do valor do comprimento de onda correspondente à máxima absorção ($\lambda_{\text{máx}}$). Permite ainda a resolução de bandas espectrais sobrepostas ou distorcidas por interferências, o desdobramento de espectros compostos e facilita a detecção de bandas de absorção afectadas pela presença de impurezas, diminuindo ou mesmo anulando interferências espectrais como a dispersão de luz. Finalmente, possui uma elevada capacidade na análise de misturas, permitindo a determinação simultânea da concentração de várias espécies em solução [13, 14, 53, 54]. Pode ser usada não só em espectrofotometria UV/Vis, como também em espectroscopia de infravermelho, de absorção atómica, de emissão em chama e fluorimetria [56].

Há, no entanto, que referir que a utilização da espectrofotometria derivativa apresenta como desvantagem a diminuição da razão sinal/ruído que se torna mais acentuada com o aumento da ordem de derivação, embora esta diminuição possa ser atenuada com a regularização ("smoothing") dos espectros derivados [56].

O coeficiente de partição molar lipossoma/água (K_p) é definido como a razão das concentrações do soluto ($[A]$) na fase membranar (m) e na fase aquosa (a). Sendo n_m e n_a o número de moles de soluto na membrana e na solução aquosa, respectivamente, K_p pode ser expresso matematicamente por [21, 57]:

$$K_p = \frac{[A]_m}{[A]_a} = \frac{n_m/V_m}{n_a/V_a} \quad (3.3)$$

em que $[A]_m$ representa a concentração de fármaco na membrana, considerando o volume de lípido (V_m) e $[A]_a$ a concentração de fármaco livre em solução, considerando o volume da fase aquosa (V_a). O coeficiente de partição pode ainda ser relacionado com as concentrações analíticas $[A_m]$ e $[A_a]$, tendo por base o volume total da suspensão, pela seguinte equação [21, 57]:

$$K_p = \frac{[A_m]/V_m}{[A_a]/V_a} \cong \frac{[A_m]}{[A_a][L]V_\phi} \quad (3.4)$$

onde $[L]$ é a concentração de lípido e V_ϕ o volume molar lipídico. Para a lecitina, fosfolípido usado neste trabalho, $V_\phi = 0,688 \text{ L.mol}^{-1}$ e a massa molar média é igual a 700 g.mol^{-1} [58].

Atendendo à definição de coeficiente de partição e considerando que a absorção de um fármaco, nas condições em que é válida a lei de Lambert-Beer, numa suspensão contendo lipossomas com diferentes concentrações de lípido, é dada por: $Abs_f = Abs_m + Abs_a$, onde Abs_m é a absorvância do fármaco que se encontra na membrana e Abs_a é a absorvância do fármaco na água, pode ser obtida a seguinte expressão que permite o cálculo do valor de K_p [13, 14, 59]:

$$Abs_f = Abs_a + \frac{(Abs_m - Abs_a) K_p [L] V_\phi}{1 + K_p [L] V_\phi} \quad (3.5)$$

Uma expressão formalmente idêntica pode ser usada para a determinação do K_p após a derivação dos espectros, substituindo Abs pela sua derivada, $A_d = (d^n Abs)/(d\lambda^n)$ [59-61]:

$$A_{df} = A_{da} + \frac{(A_{dm} - A_{da}) K_p [L] V_\phi}{1 + K_p [L] V_\phi} \quad (3.6)$$

O cálculo dos valores de K_p é efectuado pelo ajuste da equação 3.6 aos dados obtidos experimentalmente (A_d versus $[L]$) para uma determinada concentração de fármaco, por um método de regressão não linear.

3.2.2.2. Determinação do potencial-zeta

Os compostos que se encontram ionizados a um determinado valor de pH, alteram as propriedades electrostáticas da superfície das membranas quando interactivam com elas. Consequentemente, o potencial (zeta) membranar pode ser determinado para diferentes concentrações de fármaco para avaliar o coeficiente de partição do composto na membrana. A determinação do potencial-zeta (ζ) pode ser usada para o cálculo do potencial de superfície (Ψ_0), o qual, por sua vez, permite o conhecimento do valor da densidade de carga superficial (σ). Finalmente, o valor de σ torna possível a determinação do valor do número de moléculas adsorvidas por unidade de área (σ^*), que pode ser relacionado com o equilíbrio de partição do fármaco através de uma isotérmica de Langmuir. Contudo, a extrapolação do potencial, fornecido pelo potencial-zeta, a uma distância de aproximadamente 2,0 Å da superfície membranar [22] para o de superfície não constitui uma tarefa trivial. No entanto, para um sistema possuindo apenas iões monovalentes ou bivalentes a teoria de Gouy-Chapman-Stern pode ser utilizada para extrapolar os valores experimentais e, assim, obter os valores relativos ao potencial de superfície [21, 22, 62-64].

O modelo de Gouy-Chapman assume que a carga superficial da membrana está acumulada perto da sua superfície, observando-se uma variação exponencial da carga com a distância à superfície [28, 64], como se pode observar na Figura 3.3.

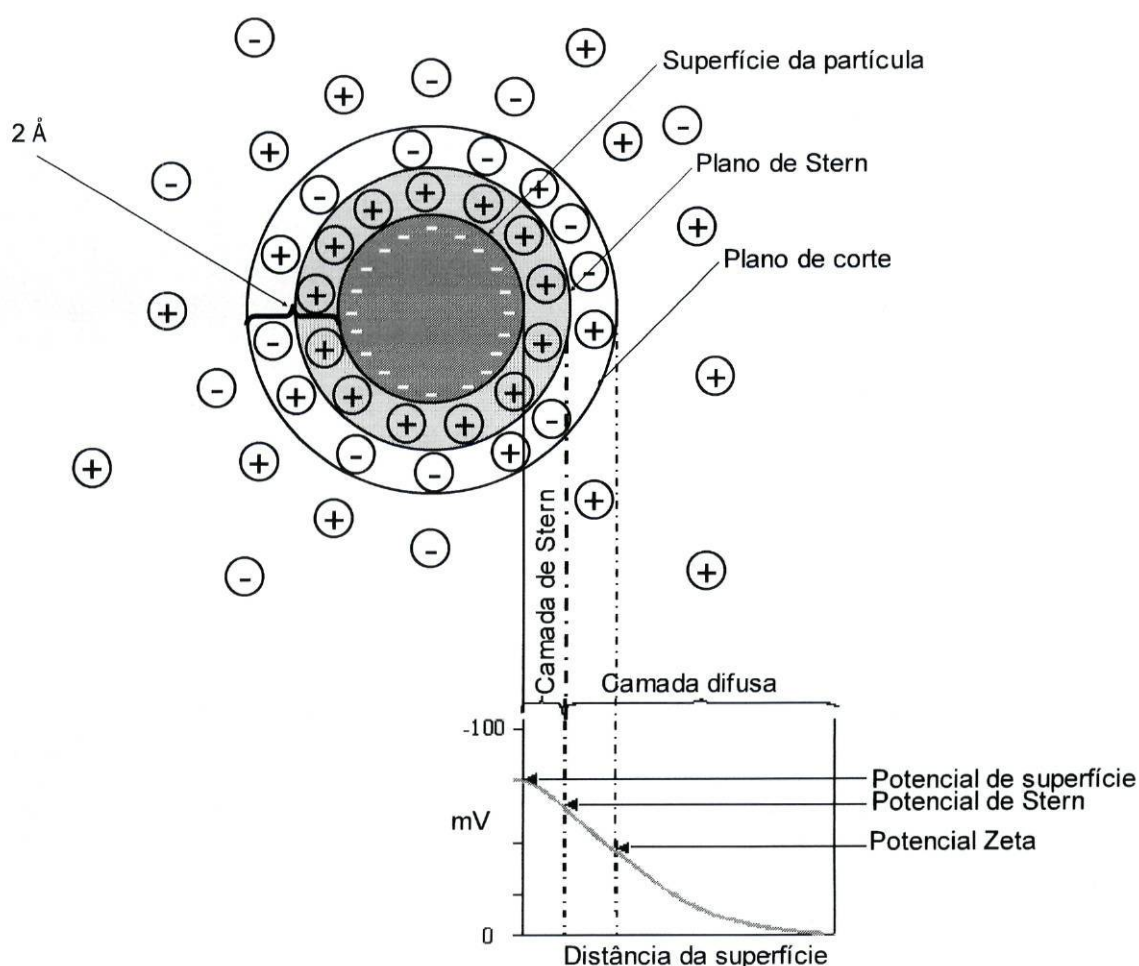


Figura 3.3: Representação esquemática da dupla camada eléctrica à superfície de uma partícula aniônica (por exemplo, lipossomas de EPC) e do perfil do potencial da membrana com a distância à superfície, segundo a teoria de Gouy-Chapman.

Uma explicação sucinta do representado na Figura 3.3 será fornecida em seguida. Assim, a Figura 3.3 apresenta a dupla camada eléctrica, que consiste num sistema electricamente neutro e compreende a camada de Stern e a camada de Gouy-Chapman ou camada difusa, à superfície de uma partícula com carga. A camada de Stern é constituída pelos contra-íons firmemente adsorvidos à interface e suas moléculas de hidratação, formando a parte fixa da dupla camada, que se estende

da superfície da partícula ao plano de Stern, como se observa na Figura 3.3. Pelo contrário, a camada de Gouy-Chapman ou camada difusa é constituída pelos contra-íões não firmemente adsorvidos à superfície, bem como co-íões e respectivas moléculas de hidratação. O plano de Stern separa, de acordo com o referido, a camada de Stern e a camada de Gouy-Chapman. Deste modo, a camada difusa inicia-se no plano de Stern e é, teoricamente, ilimitada. No entanto, como o seu potencial varia muito rapidamente com a distância à superfície, considera-se a sua espessura dada por $1/\kappa$, que equivale à distância na qual o potencial decresce na razão $1/e$ (carga do electrão). Como a espessura da camada fixa (Stern) é geralmente pequena (menor que 1 nm) em comparação com $1/\kappa$, este valor pode ser considerado como igual à espessura inteira da dupla camada [64].

Quando uma partícula coloidal se move como resultado da aplicação de um campo eléctrico, a camada fixa e algumas moléculas de solvente da camada difusa movem-se com ela como uma unidade. O limite externo desta unidade é denominado superfície de corte ou plano de corte ("shear plane"), também assinalado na Figura 3.3 [64]. O potencial da superfície de corte é denominado potencial-zeta ou electrocinético, porque determina a velocidade do movimento da partícula no campo eléctrico [64] e é calculado a partir da medida da mobilidade electroforética (equação 2.2 do capítulo 2).

A teoria de Gouy-Chapman, contudo, não considera a capacidade dos íões interagirem com os grupos polares da membrana, sugerindo que os íões com igual valência produziram o mesmo potencial-zeta e potencial de superfície nas bicamadas fosfolipídicas. O efeito ignorado pela teoria de Gouy-Chapman foi considerado por Stern originando a teoria de Gouy-Chapman-Stern, que contabiliza efeitos electrostáticos e de ligação.

A extensão de distribuição de um composto entre a fase aquosa e a membrana lipídica (K_p) pode ser determinada a partir dos valores de potencial-zeta usando uma isotérmica de Langmuir [21, 22, 65]:

$$\sigma_{A^-}^* = K_p^* \sigma_{\max}^{*A^-} [A_i^-] \quad (3.7)$$

$$\sigma_{AH}^* = K_p^* \sigma_{\max}^{*AH} [AH_i] \quad (3.8)$$

$$\sigma_{A^T}^* = K_p^* \sigma_{\max}^{*A^T} [A_i^T] \quad (3.9)$$

onde $\sigma_{A^-}^*$, σ_{AH}^* e $\sigma_{A^T}^*$ correspondem ao número de moléculas carregadas negativamente, neutras e totais adsorvidas por unidade de área, $\sigma_{\max}^*$ o número máximo de moléculas para cada uma ou para a totalidade das formas de uma molécula referidas adsorvidas por unidade de área e $[A_i^-]$, $[AH_i]$ e $[A_i^T]$ representa a concentração de moléculas carregadas, neutras e totais na interface, respectivamente. Adicionalmente, o parâmetro $\sigma_{A^T}^*$ é igual à soma de $\sigma_{A^-}^*$ e σ_{AH}^* e $[A_i^T]$ é igual ao somatório das concentrações das espécies carregadas e neutras. No entanto, o coeficiente de partição aparente K_p^* necessita de ser transformado em K_p , para poder ser relacionado com os valores de coeficiente de partição obtidos nas outras metodologias (espectrofotometria derivativa UV/Vis e desactivação de fluorescência) utilizadas neste trabalho para a determinação deste mesmo parâmetro. O valor de K_p pode ser determinado pela utilização da seguinte fórmula [21]:

$$K_p^* = K_p \times \frac{[L]a_A + \bar{n}[L]a_L}{[A_m]a_A + [L]a_L} \quad (3.10)$$

onde $[A_m]$ é a concentração de fármaco na membrana, a_A e a_L a área molecular do fármaco e do lípido, respectivamente, e $\bar{n}$ a razão molar máxima lípido:fármaco.

Segundo a teoria de Gouy-Chapman-Stern [21, 22, 62-64] acerca da dupla camada eléctrica difusa, o potencial electrostático a uma distância x da membrana (Ψ_x), para uma solução constituída apenas por iões monovalentes ou bivalentes, pode ser descrito pela expressão [22, 62]:

$$\Psi_x = \frac{2KT}{e} \ln \frac{[1 + \alpha \exp(-\kappa x)]}{[1 - \alpha \exp(-\kappa x)]} \quad (3.11)$$

onde k representa a constante de Boltzmann ($1,38066 \times 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$), T a temperatura absoluta (K), e a carga do electrão ($1,602 \times 10^{-19} \text{ C}$), κ o recíproco do comprimento da dupla camada (a espessura da dupla camada é quantificado por $1/\kappa$), e α , que é dependente do valor de Ψ_0 , é definido como:

$$\alpha = \frac{\exp\left(\frac{e\Psi_0}{2kT}\right) - 1}{\exp\left(\frac{e\Psi_0}{2kT}\right) + 1} \quad (3.12)$$

O valor de κ é dado pela seguinte equação [21, 22]:

$$\kappa = \left[\frac{2e^2 C N}{\epsilon_r \epsilon_0 k T} \right]^{1/2} \quad (3.13)$$

sendo N o número de Avogadro ($6,02205 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$), C a concentração total de espécies carregadas em solução, ϵ_r representa a constante dielétrica da água (78,54 a 25°C) e ϵ_0 a permissividade do espaço livre ($8,85419 \times 10^{-12} \text{ J}^{-1}\text{C}^2\text{m}^{-1}$).

Resolvendo a equação 3.11 em ordem a α , obtém-se uma expressão (3.14) que permite a determinação do valor de α correspondente a Ψ_x .

$$\alpha = \frac{\exp\left(\frac{e}{2kT} \Psi_x\right) - 1}{\exp(-\kappa x) \left[\exp\left(\frac{e}{2kT} \Psi_x\right) + 1 \right]} \quad (3.14)$$

De facto, se forem conhecidos os valores de Ψ a uma distância x a partir da superfície, é possível o cálculo dos valores de α , o que não era viável pela equação 3.12. Adicionalmente, pode-se observar que para um dado valor de T e concentração total, α depende apenas de Ψ_0 , e que para um dado Ψ_0 o seu valor torna-se constante. Deve ser, no entanto, salientado que esta equação, apesar de similar à equação 3.12, relaciona α com os valores experimentais de Ψ e não com os de Ψ_0 . Deve ainda ser lembrado que este método baseia-se na equação 3.11, e, deste modo, apenas pode ser aplicado a iões monovalentes ou bivalentes.

Obviamente, o valor de Ψ_0 está relacionado com α por (resolvendo a equação 3.12 em ordem a Ψ_0):

$$\Psi_0 = \frac{2kT}{e} \ln \frac{1+\alpha}{1-\alpha} \quad (3.15)$$

e, por conseguinte, é possível calcular Ψ_0 , se o valor de Ψ a uma distância x da superfície for conhecido.

Foi demonstrado que os valores de potencial-zeta (ζ) correspondem ao potencial a uma distância de 2 Å da superfície da membrana [21, 22], assim $\zeta = \Psi_2$, no qual Ψ_2 indica o valor de Ψ a $x = 2$ Å. Usando os valores de Ψ_2 e deixando $x = 2$ Å na equação 3.14, é possível obter α , e a partir da equação 3.15 o valor de Ψ_0 .

Assim, os valores de potencial-zeta permitem estimar o valor de Ψ_0 , os quais, por sua vez, possibilitam a determinação da densidade de carga superficial na membrana, σ . A determinação deste último parâmetro é importante para o cálculo do K_p , pois, como será descrito posteriormente, está relacionado com o valor de σ^* , cujo conhecimento é necessário.

A relação entre σ e Ψ_0 pode ser obtida pela equação de Grahame, referida por vários autores no tratamento da ligação de espécies iónicas a membranas [21, 63, 65]:

$$\sigma = \left[2000 \epsilon_r \epsilon_0 RT \sum_i C_i \left(\exp \left(\frac{-z_i F \Psi_0}{RT} \right) - 1 \right) \right]^{1/2} \quad (3.16)$$

onde R é a constante dos gases perfeitos ($8,31441 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$) e F a constante de Faraday ($9,64846 \times 10^4 \text{ Cmol}^{-1}$). C_i denota a concentração dos iões em solução, devendo ser incluídos no somatório todos os iões presentes. Se a membrana é inicialmente neutra, σ corresponde à concentração superficial de iões adsorvidos [29].

Como apenas as formas carregadas da molécula que se ligam à membrana é que afectam o valor de Ψ_0 , se este valor é conhecido, a aplicação da equação 3.16 fornece σ_{A^-} e consequentemente é possível calcular $\sigma_{A^-}^*$. De facto, o parâmetro σ , pode ser expresso em número de moléculas carregadas por unidade de área, denominado, como referido anteriormente, por σ^* , através da fórmula [21]:

$$\sigma^* = \frac{\sigma N}{F} \quad (3.17)$$

tendo N e F a mesma conotação que a explicitada em equações anteriores.

O valor de σ_{AH}^* pode ser obtido através de uma equação análoga à equação de Henderson-Hasselbalch [65]:

$$\sigma_{AH}^* = \frac{\sigma_{A^-}^*}{10^{pH-pK_m}} \quad (3.18)$$

onde K_m é a constante de acidez para o composto ligado.

Os valores de σ_{max}^* podem ser obtidos tendo em conta a observação de que, para todos os fármacos e para todas as concentrações de lípido, os valores de σ^* aumentam com a concentração total de fármaco, mas tornam-se constantes a elevadas concentrações de fármaco. Este comportamento pode ser descrito pela seguinte isotérmica de adsorção [21, 66]:

$$\theta = \frac{K_b [A^T]}{1 + K_b [A^T]} \quad (3.19)$$

na qual θ , o grau de saturação, é dado por $\theta = \sigma^* / \sigma_{max}^*$ e K_b representa a constante de ligação, uma vez que a interacção de qualquer composto A com a membrana lipídica pode também ser considerada como um equilíbrio de ligação. Adicionalmente, o conhecimento do número máximo de moléculas carregadas por unidade de área, σ_{max}^* , permite o cálculo da razão molar máxima lípido:fármaco (ambas as formas), $\bar{n}$, o qual é independente da concentração de lípido [21] e necessário para o cálculo do K_p :

$$\sigma_{max}^* = \frac{1}{a_A + \bar{n} a_L} \quad (3.20)$$

Pelo referido até ao momento, a determinação do valor de potencial-zeta permite a determinação de Ψ_0 , e, deste modo, o cálculo não apenas de $\sigma_{A^-}^*$ e $\sigma_{max}^{*A^-}$, mas também de $[A_i^-]$, como será descrito em seguida. De facto, como a concentração da forma neutra de fármaco (AH) não é afectada pelo potencial de membrana, deve ser aproximadamente igual à concentração na fase aquosa, e deste modo $[AH_i] \cong [AH_a]$. Contudo, a partição de espécies carregadas negativamente, A^- , vai levar a uma carga na membrana que irá repelir iões com a mesma carga e, consequentemente, no equilíbrio, a concentração da forma carregada na interface,

$[A_i^-]$, será menor que na fase aquosa, $[A_a^-]$. Uma vez que apenas o fármaco na vizinhança da membrana pode estabelecer equilíbrio de partição, o valor de K_p é calculado usando $[A_i^-]$, que pode ser obtida usando a equação de Boltzmann [29]:

$$[A_i^-] = [A_a^-] \exp\left(\frac{-zF\Psi_0}{RT}\right) \quad (3.21)$$

na qual F , R e T apresentam os significados usuais e z é a carga do ião. Para determinar o valor de $[A_i^-]$ é necessário saber o valor de $[A_a^-]$, o qual pode ser determinado pela equação de Henderson-Hasselbach [21]:

$$[A_a^-] = \frac{[A_a^T]}{1 + \frac{1}{10^{\text{pH}-\text{pK}_a}}} \quad (3.22)$$

desde que $[A_a^T]$ seja conhecido.

O valor de $[A_a^T]$ pode ser calculado a partir da equação $[A_a^T] = [A^T] - [A_m^T]$, onde $[A^T]$ representa a concentração total de fármaco adicionada à solução. O número de moléculas ligadas por unidade de área de superfície de membrana, $\sigma_{A^T}^*$, está relacionado com $[A_m^T]$ pela seguinte fórmula matemática [21, 65]:

$$\sigma_{A^T}^* = \frac{[A_m^T]}{[L]a_L + [A_m^T]a_A} \quad (3.23)$$

a qual pode ser resolvida em ordem a $[A_m^T]$ originando:

$$[A_m^T] = \frac{(\sigma_{A^-}^* + \sigma_{AH}^*)[L]a_L}{1 - (\sigma_{A^-}^* + \sigma_{AH}^*)a_A} \quad (3.24)$$

O valor de $[A_a^T]$ é assim determinado, uma vez que a quantidade de composto adicionado, $[A^T]$, é uma concentração conhecida.

Equações formalmente idênticas à equação 3.22 podem ser obtidas para $[A_m^-]$ e $[AH_m]$:

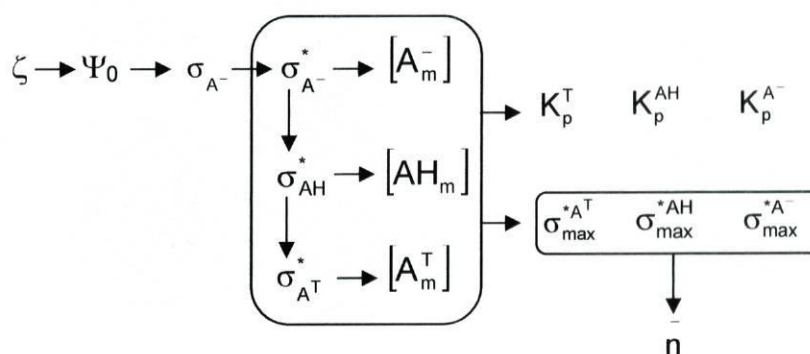
$$[A_m^-] = \frac{\sigma_{A^-}^* - [L] a_L}{1 - \sigma_{A^-}^* a_A} \quad (3.25)$$

e

$$[AH_m] = \frac{\sigma_{AH}^* [L] a_L}{1 - \sigma_{AH}^* a_A} \quad (3.26)$$

o que torna possível calcular as concentrações de todas as espécies, tanto na fase lipídica como também na fase aquosa, considerando $[AH_i] \cong [AH_a]$.

Este método requer, então, apenas o conhecimento da concentração total de fármaco adicionada à solução e a determinação do valor de potencial-zeta para calcular a concentração de todas as formas de um composto A em solução, e, deste modo, o coeficiente de partição de ambas as formas do composto e do K_p^T entre o meio lipídico e a solução aquosa, como descrito no seguinte esquema [21]:



3.2.2.3. Desactivação de fluorescência

A determinação quantitativa do coeficiente de partição entre as fases lipídica e aquosa, pela técnica de desactivação de fluorescência, baseia-se na variação da constante aparente de Stern-Volmer com a concentração de lípido. Para concentrações de lípido mais baixas, a adição de uma determinada quantidade de desactivador causa uma desactivação de fluorescência superior à observada em concentrações de lípido superiores, uma vez que o aumento da pseudo-fase lipídica disponível para dissolver o desactivador vai originar menores concentrações deste [23]. Assim, concentrações menores de lípido apresentam valores superiores das constantes aparentes de Stern-Volmer. Esta variação da constante aparente de Stern-Volmer com o aumento da concentração lipídica permite, assim, o cálculo do coeficiente de partição do desactivador.

Deve-se referir, no entanto, que apesar da desactivação de fluorescência poder ser do tipo dinâmica (colisional) ou estática (descrito mais pormenorizadamente em 3.2.3), a sua distinção não é estritamente necessária, neste método experimental. De facto, os modelos que usam a variação da constante de Stern-Volmer com a concentração de lípido para a determinação do valor de K_p são aplicáveis de uma forma generalizada, quer a desactivação seja do tipo dinâmico ou estático [67].

A diminuição da intensidade de fluorescência (I), usualmente denominada por desactivação de fluorescência, pode ser relacionada com a concentração do desactivador pela equação de Stern-Volmer [23]:

$$\frac{I_0}{I} - 1 = K_{SV} [Q]_m \quad (3.27)$$

onde I_0 e I simbolizam a intensidade de fluorescência do fluoróforo na ausência e na presença do desactivador, respectivamente, K_{SV} é a constante de Stern-Volmer e $[Q]_m$ é a concentração do desactivador na pseudo-fase lipídica. Com efeito, quando o desactivador partilha entre as fases aquosa e lipídica, a desactivação de fluorescência do fluoróforo distribuído homogeneamente pela membrana é apenas determinada pela concentração do desactivador na pseudo-fase lipídica. No entanto, a equação de Stern-Volmer pode também estar relacionada com a concentração total de desactivador adicionado ao sistema pela equação reescrita do seguinte modo:

$$\frac{I_0}{I} - 1 = K_{SV}^{app} [Q]_T \quad (3.28)$$

em que $[Q]_T$ é a concentração total de fármaco (dado pela soma das concentrações nas fases aquosa e membranar) e K_{SV}^{app} é a constante aparente de Stern-Volmer [68].

Os valores de K_{SV}^{app} , determinados pelo declive das rectas resultantes da aplicação da equação 3.28 aos dados experimentais ($I_0/I - 1$ versus $[Q]_T$), dependem não só da eficiência da desactivação de fluorescência pelo desactivador e da constante de Stern-Volmer, mas também do seu coeficiente de partição (K_p) entre as fases aquosa e lipídica, pois apenas as moléculas de fármaco na membrana são as responsáveis pela desactivação da fluorescência. Assim, a variação da constante aparente de Stern-Volmer com o aumento da concentração lipídica permite o cálculo do coeficiente de partição do desactivador e do valor de K_{SV} através da seguinte equação, por um método de regressão não linear [68]:

$$K_{SV}^{app} = K_{SV} \frac{K_p}{K_p V_m + 1} \quad (3.29)$$

onde V_m é o volume de lípido e corresponde ao produto da concentração de EPC e do volume molar lipídico, V_ϕ .

Nesta metodologia, deve-se ter em conta que também o desactivador pode absorver no comprimento de onda de excitação. Deste modo, quando há um aumento da concentração do desactivador podem-se observar dois fenómenos [69]: a) aumento da fracção de luz excitada absorvida pelo desactivador, e b) o aumento total da absorvância da sonda na amostra, o que provoca uma menor penetração da luz de excitação dentro da solução, e este facto implica uma diminuição da intensidade fluorescente detectada para um correcto ângulo geométrico. Deste modo, é necessário corrigir as medições da intensidade de fluorescência, multiplicando esses valores por um factor de correcção (C), através da equação [69]:

$$C = \frac{A_t}{A_f} \left(\frac{1 - 10^{-A_f}}{1 - 10^{-A_t}} \right) \quad (3.30)$$

em que A_f e A_t representam, respectivamente, as absorvâncias obtidas para o fluoróforo e para a solução total no comprimento de onda de excitação.

3.2.3. Determinação da localização por desactivação de fluorescência

Os estudos de localização membranar efectuados por desactivação de fluorescência baseiam-se na diminuição de fluorescência emitida por um fluoróforo, quando este interacciona com uma molécula que o rodeia. De facto, a fluorescência emitida por um determinado fluoróforo contém informações relacionadas não apenas com o fluoróforo, mas também acerca das moléculas que o rodeiam. Assim, o fundamento do método de desactivação de fluorescência em estruturas organizadas, como os lipossomas, envolve um fluoróforo solubilizado no interior da estrutura ou adsorvido à sua superfície, cuja fluorescência é desactivada pela presença do soluto que pode partilhar entre a fase organizada e o solvente. A velocidade e/ou extensão com que o desactivador penetra na estrutura, bem como a velocidade de difusão até ao fluoróforo, vão determinar a cinética do processo de desactivação, sendo que a extensão da desactivação de fluorescência é inversamente proporcional à distância entre o fluoróforo e o desactivador [70].

A desactivação de fluorescência pode ser dinâmica (ou colisional) ou estática. No primeiro caso, o fluoróforo que se encontra no estado excitado, é desactivado devido ao contacto com uma molécula, denominado agente de desactivação da fluorescência (ou desactivador). Deste modo, o fluoróforo volta ao seu estado fundamental durante o contacto com o desactivador. Na desactivação estática, o fluoróforo no estado fundamental forma um complexo não fluorescente com o desactivador [23].

Estes dois fenómenos podem ser traduzidos por equações de Stern-Volmer do mesmo tipo, apresentando, contudo, diferentes designações para as constantes presentes nas equações. Deste modo, essa constante é denominada na desactivação colisional de constante de Stern-Volmer e na desactivação estática de constante de formação do complexo. Para ambos os mecanismos referidos, observa-se uma relação linear entre a diminuição de fluorescência e a concentração do desactivador [23].

Quando a desactivação é do tipo dinâmica ou colisional, os fluoróforos só são afectados no estado excitado e, deste modo, não se verificam alterações dos

espectros de absorção, mas apenas uma diminuição da intensidade nos espectros de excitação. Pelo contrário, no caso da desactivação ser estática há formação de complexos fluoróforo-desactivador no estado fundamental, que pode ter como consequência uma alteração dos espectros de absorção [23]. Portanto, um método de distinção entre os dois tipos de desactivação de fluorescência consiste em examinar o espectro de absorção do fluoróforo. A distinção dos dois mecanismos de desactivação pode ainda ser conseguida pela determinação dos tempos de semi-vida do fluoróforo, uma vez que enquanto que para a desactivação por um mecanismo colisional o decréscimo da intensidade de fluorescência é igual ao decréscimo dos tempos de semi-vida do fluoróforo, na desactivação estática isto não se verifica. Outro método de distinção entre os dois tipos de desactivação de fluorescência consiste na determinação da constante de desactivação dos dois processos a várias temperaturas. Com efeito, o aumento da temperatura faz diminuir a viscosidade do meio e, consequentemente, aumenta a difusão das moléculas, aumentando a desactivação dinâmica. Pelo contrário, esse aumento de temperatura diminui a desactivação estática, uma vez que a estabilidade dos complexos é reduzida [23]. Deve ainda ser referido que os processos de desactivação de fluorescência nem sempre são representados por uma relação linear entre a diminuição de fluorescência e a concentração do desactivador, através da equação de Stern-Volmer [23], podendo observar-se desvios positivos (contra o eixo das abcissas) ou negativos (a favor deste eixo), que traduzem fenómenos adicionais ou alternativos de desactivação de fluorescência.

Em qualquer dos casos referidos, para que a desactivação de fluorescência se verifique é necessário que ocorra interacção entre o fluoróforo e o desactivador, o que justifica as numerosas aplicações desta técnica. Por exemplo, este método tem sido usado para revelar a acessibilidade de desactivadores a fluoróforos incorporados em membranas, na determinação de coeficientes de partição dos desactivadores (como referido anteriormente) e em estudos de localização dos mesmos nas membranas [23].

A desactivação de fluorescência é, então, utilizada como um método indirecto para inferir acerca da localização de um desactivador na membrana lipídica, uma vez que se baseia na diminuição da intensidade de fluorescência emitida por uma sonda de fluorescência. No entanto, nos estudos de localização por este método, é necessário o conhecimento mais exacto possível da localização das sondas na bicamada, a assunção de que todas as sondas têm a mesma eficácia intrínseca de

desactivação [71] e a identificação do grupo químico responsável pela desactivação [68]. Adicionalmente, as sondas de fluorescência devem ainda possuir: a) um elevado coeficiente de partição membrana/solução aquosa, de modo a que a sua incorporação na bicamada seja a mais completa possível, ou então, um rendimento de fluorescência na fase aquosa praticamente nulo; b) um valor de rendimento de fluorescência (número de fótons emitidos pelo fluoróforo relativamente ao número de fótons absorvidos) na membrana elevado, para que a relação sinal/ruído seja aceitável; c) um valor do tempo de vida do estado excitado significativo; d) bandas de absorção e fluorescência distintas das do sistema membranal em estudo; e) características que não causem alteração da estrutura da membrana ou promovam a agregação ou fusão das vesículas; f) sensibilidade à propriedade membranal que se pretende estudar; g) uma pureza elevada; h) elevada resistência à fotodegradação ou fotodimerização durante a excitação [20]. O cumprimento destes requisitos permitirá o uso do fluoróforo em concentrações muito inferiores às do lípido ou desactivador (fármaco) usadas, de modo que a alteração das características físico-químicas dos sistemas micro-heterogéneos seja desprezável.

Actualmente, existe uma vasta gama de compostos utilizados como sondas de fluorescência, entre os quais se encontram, por exemplo, as moléculas de DPH (1,6-fenil-1,3,5-hexatrieno), DPH-PA (ácido 3- (*p*- (6-fenil) 1,3,5-hexatrienil)fenilpropiónico) e as sondas da série *n*-AS. De facto, os parâmetros necessários a considerar para a realização do estudo em questão, têm vindo a ser estudados ao longo dos anos e estão razoavelmente documentados para as sondas *n*-AS usadas neste estudo [67, 68, 72-76] e, deste modo, tornou-se possível a utilização deste método para prever a localização das diferentes moléculas na membrana. Esta série de sondas apresenta ainda as seguintes características [70]: a) os constituintes desta série apresentam espectros e desactivação de fluorescência semelhantes em solventes de viscosidade e polaridade variadas; b) as suas posições relativas num grande número de estruturas (micelas, bicamadas lipídicas e membranas naturais) são conhecidas; c) a solubilização nas estruturas organizadas é favorecida em relação à solubilização em meio aquoso; e d) o valor do tempo de vida do estado excitado em diversas estruturas é conhecido. Assim, esta série de sondas tem sido largamente utilizada em estudos de localização de moléculas, assim como na determinação da extensão de incorporação das mesmas em modelos membranares, membranas celulares ou mesmo em células inteiras [15, 72, 76-78].

Para a desactivação de fluorescência se verificar, é necessário que o desactivador (fármaco) esteja localizado na proximidade do fluoróforo para que possa ocorrer interacção entre eles. Assim, a eficácia relativa de desactivação de uma série de sondas pode ser usada para inferir acerca da localização relativa de uma molécula nos lipossomas. Com efeito, os valores da constante aparente de Stern-Volmer (K_{SV}^{app}) são, por vezes, utilizados para inferir acerca da localização relativa de uma molécula na membrana [15, 71, 78-80]. Os valores de K_{SV}^{app} podem ser calculados pela aplicação da equação clássica de Stern-Volmer descrita para a desactivação dinâmica ou colisional (equação 3.28) aos valores experimentais. Deste modo, a representação gráfica de $I_0/I - 1$ em função da concentração total de fármaco origina uma recta com declive igual a K_{SV}^{app} . No entanto, a determinação da localização de fármacos na membrana pelos valores de K_{SV}^{app} baseia-se no pressuposto de que todas as sondas possuem a mesma eficácia intrínseca de desactivação de fluorescência [71]. Isto é verdade em solventes homogéneos, mas em membranas fosfolipídicas é bem conhecida a existência de um gradiente de fluidez e de polaridade ao longo do plano da membrana, que se reflecte em diferentes valores de τ_0 (tempo de vida do estado excitado) para cada sonda. Consequentemente, torna-se necessário o cálculo da constante bimolecular de desactivação de fluorescência, K_q , que reflecte a acessibilidade do desactivador para o fluoróforo e elimina as diferenças do microambiente que rodeia as sondas [23]. Este parâmetro pode ser determinado usando o valor de τ_0 determinado para cada sonda, a pH 7,4 [15, 58, 72, 73, 75, 76, 81, 82] pela equação:

$$K_q = K_{SV} / \tau_0 \quad (3.31)$$

ou

$$K_q^{app} = K_{SV}^{app} / \tau_0 \quad (3.32)$$

onde K_q^{app} corresponde à constante bimolecular aparente de desactivação de fluorescência.

O conhecimento do valor de K_p permite o cálculo do valor de K_{SV} pela expressão matemática 3.29, o qual, por sua vez, possibilita a determinação do valor de K_q .

Deve-se, finalmente, referir que os valores de intensidade de fluorescência, medidos experimentalmente, foram corrigidos pela equação 3.30, devido à mesma razão descrita no item 3.2.2.3.

3.2.4. Avaliação de propriedades membranares

3.2.4.1. Determinação do diâmetro e potencial-zeta dos lipossomas

A determinação do diâmetro e potencial-zeta dos lipossomas foi efectuada de acordo com o descrito no capítulo 2.

Os valores de diâmetro e de potencial-zeta obtidos experimentalmente foram directamente correlacionados com o tamanho e as propriedades electrostáticas dos lipossomas.

3.2.4.2. Determinação da fluidez membrana por anisotropia de fluorescência

A anisotropia de fluorescência baseia-se no princípio da excitação fotoselectiva dos fluoróforos por luz polarizada e é medida pelo grau de polarização da luz emitida [23]. De facto, após a excitação com luz polarizada, a emissão de luz por muitas substâncias também é polarizada, e a extensão da polarização da luz emitida é descrita em termos de anisotropia (r) [23].

Os fluoróforos absorvem, preferencialmente, fótons cujos vectores eléctricos estão alinhados paralelamente aos momentos de transição do fluoróforo, que ocorrem ao longo de direcções específicas dentro da estrutura do fluoróforo. Em soluções homogéneas, os fluoróforos no estado fundamental estão orientados de modo aleatório. Quando expostos a luz polarizada, os fluoróforos, que têm os seus momentos de transição de absorção orientados ao longo do vector eléctrico da luz incidente, são preferencialmente excitados. Consequentemente, a população de fluoróforos excitada não está aleatoriamente orientada e a emissão de fluorescência será polarizada [23].

A despolarização da luz emitida pode ser causada por uma série de fenómenos, sendo a difusão rotacional dos fluoróforos uma das causas mais comuns de despolarização da luz. As medições de anisotropia revelam que pode haver uma alteração da média angular, que ocorre entre a absorção e a consequente emissão do fóton pelo fluoróforo. Esta alteração angular está dependente da proporção e extensão da difusão rotacional do fluoróforo durante o tempo de vida do estado excitado. Todos estes movimentos difusos estão relacionados e dependem da viscosidade do meio e do tamanho e forma da molécula em rotação. Para os fluoróforos em solução, a sua capacidade rotacional está dependente da viscosidade imposta pelo solvente. Como resultado, uma mudança na viscosidade do solvente irá resultar numa alteração da anisotropia de fluorescência [23].

A medição da anisotropia de fluorescência de estado estacionário é uma ferramenta preciosa no estudo da dinâmica rotacional de uma molécula presente na membrana e, por consequência, das características dinâmicas da própria membrana. Uma vez que a alteração da orientação de um fluoróforo reflecte as características do meio circundante, nomeadamente as restrições impostas à rotação livre daquele, pode ser usada nas medições de anisotropia para descrever a fluidez da bicamada lipídica.

Os estudos com sondas de fluorescência para avaliar as propriedades físicas das membranas sintéticas e biológicas apresentam as seguintes vantagens: a) permitem obter informação sobre a polaridade e microviscosidade da matriz em estudo, b) existe uma grande variedade de sondas que permitem monitorizar regiões específicas da membrana, e c) as sondas podem ser usadas em baixas concentrações, minimizando as perturbações que possam ocorrer na membrana por inclusão da sonda [23, 41, 83]. Como tal, os estudos de anisotropia com sondas fluorescentes têm sido amplamente usados para avaliar a fluidez da membrana [83]. Todavia, não é aconselhável a avaliação da ordem e da dinâmica lipídica sem considerar a estrutura e as propriedades de emissão da sonda, a sua localização na membrana e como a sua presença na bicamada pode perturbar a verdadeira ordem e dinâmica das cadeias lipídicas. De facto, as alterações de anisotropia detectadas podem ser resultado de uma verdadeira alteração da estrutura da membrana ou de uma mera alteração da posição da sonda [41]. Assim, para ultrapassar este problema, o efeito dos AINEs na microviscosidade interna das membranas foi estudado por determinações de anisotropia de estado estacionário usando as sondas *n*-AS ($n = 2, 6, 9$ e 12), uma vez que esta série de sondas de fluorescência possui um comportamento ao nível da emissão bem caracterizado e o seu local de solubilização (ou afinidade da

sonda para uma determinada localização na membrana) é conhecido com alguma certeza [72, 84]. Adicionalmente, esta série de sondas estruturalmente semelhante, com o mesmo grupo fluorescente posicionado a diferentes profundidades na bicamada, possibilita o estudo do "gradiente de fluidez" em modelos membranares ou biomembranas [72, 73, 84].

Os estudos de anisotropia de fluorescência de estado estacionário demonstraram ser úteis na monitorização da fluidez membrana, o que é corroborado pela presença na literatura de um vasto conjunto de publicações tendo por base esta metodologia [41-43]. No entanto, a validade deste parâmetro tem sido questionada. De facto, as sondas de fluorescência permitem avaliar as alterações globais da fluidez da bicamada, mas é aconselhável algum cuidado na interpretação directa dos resultados experimentais, uma vez que alterações na fluidez, devidas a agentes que as perturbem, não são uniformes em todos os segmentos das cadeias de ácidos gordos e a própria sonda pode ter influência nos resultados obtidos. Assim, para evitar interpretações ambíguas e proporcionar uma percepção clara é necessário considerar correcções apropriadas aos dados experimentais, que serão apresentadas em seguida.

Uma dificuldade no estudo da fluidez membrana, por anisotropia de estado estacionário, é a existência de limitações aos movimentos rotacionais das sondas de fluorescência quando estão inseridas em ambiente membrana.

Quando um fluoróforo se encontra solubilizado num solvente isotrópico a anisotropia de fluorescência, r , decai exponencialmente para zero, e esta despolarização é descrita pela equação de Perrin [23]:

$$r = \frac{r_0}{1 + \left(\frac{\tau}{\theta}\right)} \quad (3.33)$$

onde r_0 é a anisotropia fundamental da molécula fluorescente, θ o tempo de relaxamento rotacional do fluoróforo e τ o seu tempo de vida no estado excitado.

No entanto, quando o ambiente anisotrópico das membranas impede a livre rotação do fluoróforo, a anisotropia decai para um valor finito, r_∞ , e, por este motivo, os resultados não podem ser analisados pela equação de Perrin, mas sim pela equação de Perrin modificada [23]:

$$r = \frac{(r_0 - r_\infty) \times \theta}{\theta + \tau} + r_\infty \quad (3.34)$$

Enquanto r_∞ reflecte essencialmente a limitação à rotação da sonda pelo meio em que o fluoróforo está inserido, θ depende principalmente da resistência local à rotação, e tem sido correlacionado com a microviscosidade da membrana pela equação de Stokes-Einstein [23].

$$\theta = \frac{\bar{\eta} \times V}{RT} \quad (3.35)$$

em que $\bar{\eta}$ é a microviscosidade, T a temperatura em K, R a constante dos gases perfeitos e V o volume da unidade rotativa. Deste modo, variações no valor de r podem estar relacionadas com modificações de θ , que está directamente relacionado com a microviscosidade, uma vez que V/RT , a uma dada temperatura, permanece constante para cada sonda. Assim, a fluidez da membrana, como o recíproco da viscosidade, pode ser expressa em termos de movimentos anisotrópicos das cadeias acil dos fosfolípidos.

No entanto, estudos prévios em membranas [82] mostraram que, sob certas condições, o movimento das sondas n -AS está totalmente desimpedido, ou seja, r_∞ é igual a zero nas membranas em fase fluída e qualquer que seja o nível considerado de profundidade membranar. Deste modo, para avaliar o efeito dos AINEs em estudo na fluidez de lipossomas de EPC pela equação de Perrin (equação 3.33), as medições foram efectuadas a 25°C, uma vez que a este valor de temperatura as vesículas de EPC se encontram na fase fluída [85] e a um comprimento de onda de excitação apropriado para as sondas n -AS, com valor igual a 384 nm [82]. Sob estas condições o valor de r_∞ é igual a zero e, deste modo, a equação de Perrin (equação 3.33) pode ser utilizada para a descrição da anisotropia de estado estacionário [82].

Para além da limitação relacionada com a rotação da sonda existente num meio anisotrópico, há também o problema dos resultados experimentais poderem ser influenciados pela própria sonda inserida na membrana. De facto, as alterações de anisotropia, observadas para concentrações crescentes de fármaco, podem ser causadas não só por alterações na microviscosidade da membrana, mas também por variações no tempo de vida do estado excitado do fluoróforo, τ' , ou na posição da

sonda na membrana [23]. Este último problema não se observa nos estudos realizados com as sondas *n*-AS, pois possuem localização membranar bem conhecida, como já referido anteriormente [72, 84].

Os valores de τ' , quando a desactivação de fluorescência causada pelos fármacos é do tipo colisional (o que se verifica no presente estudo), podem ser facilmente determinados a partir da seguinte expressão [23]:

$$\frac{I_0}{I} = \frac{\tau_0}{\tau'} \quad (3.36)$$

onde I_0/τ_0 e I/τ' correspondem, respectivamente, à intensidade de fluorescência/tempo de vida do fluoróforo na ausência e presença do fármaco desactivador. A diminuição de τ' ocorre, porque a desactivação de fluorescência é um processo adicional que reduz o número de fluoróforos no estado excitado, e esta redução origina valores de I menores. É, assim, possível o cálculo de τ' , uma vez que τ_0 é característico de cada sonda [82] e I_0/I podem ser obtidos por medição da intensidade de fluorescência.

A utilização de condições experimentais bem definidas, para as quais r_∞ é igual a zero, torna possível a obtenção dos valores da anisotropia corrigida (corrigida para alterações do τ), r' , pela seguinte equação:

$$r' = \frac{r_0}{1 + \left(\frac{\tau'}{\theta}\right)} \quad (3.37)$$

A divisão da equação 3.33 pela equação 3.37, seguida de rearranjo, origina a seguinte expressão:

$$r' = \frac{\theta + \tau_0}{\theta + \tau'} \times r_{ss} \quad (3.38)$$

Considerando na equação 3.38, r_{ss} como o valor medido para τ_0 (na ausência de desactivador) e os valores publicados de θ e τ_0 para as sondas *n*-AS [82], é possível obter os valores de anisotropia corrigida, r' . Estes valores de r' correspondem à alteração de anisotropia devida à variação dos tempos de vida do fluoróforo, proporcionando, assim, uma correcção para a influência da própria sonda na

microviscosidade da membrana. Os valores de r' obtidos são depois comparados com os valores experimentais de anisotropia (r_{ss}). Através da diferença entre r_{ss} e r' , é possível obter a variação real de anisotropia relacionada com a alteração da fluidez da membrana causada pela presença do fármaco e sem o efeito da variação intrínseca devida ao decréscimo do tempo de vida da sonda de fluorescência. Quando os valores referentes a r_{ss} são maiores que os obtidos para r' , pode-se concluir que a fluidez da membrana diminuiu. Pelo contrário, o decréscimo da diferença entre r_{ss} e r' , na presença de concentrações crescentes de AINEs, está relacionado com a fluidificação da membrana. A diferença entre r_{ss} e r' é, assim, uma medida do efeito de fluidificação.

Como apenas as moléculas de fármaco que se encontram localizadas no interior da membrana são as responsáveis pelas possíveis alterações da fluidez membranar, pode-se efectuar o cálculo da concentração de AINE na membrana. Assim, o conhecimento do valor de K_p permitiu determinar a concentração dos AINEs na membrana, $[Q]_m$, pela seguinte fórmula matemática [23]:

$$[Q]_m = \frac{K_p [Q]_T}{K_p \alpha_m + (1 - \alpha_m)} \quad (3.39)$$

onde $[Q]_T$ é a concentração total de fármaco e α_m é o volume da fracção da fase membranar ($\alpha_m = V_m / V_T$; V_m e V_T representa os volumes das fases membranar e aquosa, respectivamente).

3.3. PARTE EXPERIMENTAL

3.3.1. Reagentes

Além dos reagentes mencionados no capítulo 2, foram ainda utilizados os seguintes reagentes. O ácido (+)-2-(9-antroiloxi) esteárico (2-AS), o ácido (+)-6-(9-antroiloxi) esteárico (6-AS) e o ácido (+)-9-(9-antroiloxi) esteárico (9-AS) foram adquiridos à Molecular Probes e o ácido (+)-12-(9-antroiloxi) esteárico (12-AS) à Sigma-Aldrich. Os restantes reagentes foram requeridos à Merck.

3.3.2. Determinação espectrofotométrica das constantes de acidez

As constantes de acidez dos anti-inflamatórios não esteróides diclofenac e clonixina foram determinadas por espectrofotometria UV/Vis em solução aquosa com força iónica ajustada a 0,1 M com NaCl. Na Figura 3.4 está representado, de uma forma esquemática, o sistema automático de titulação em fluxo para determinação das constantes de acidez.

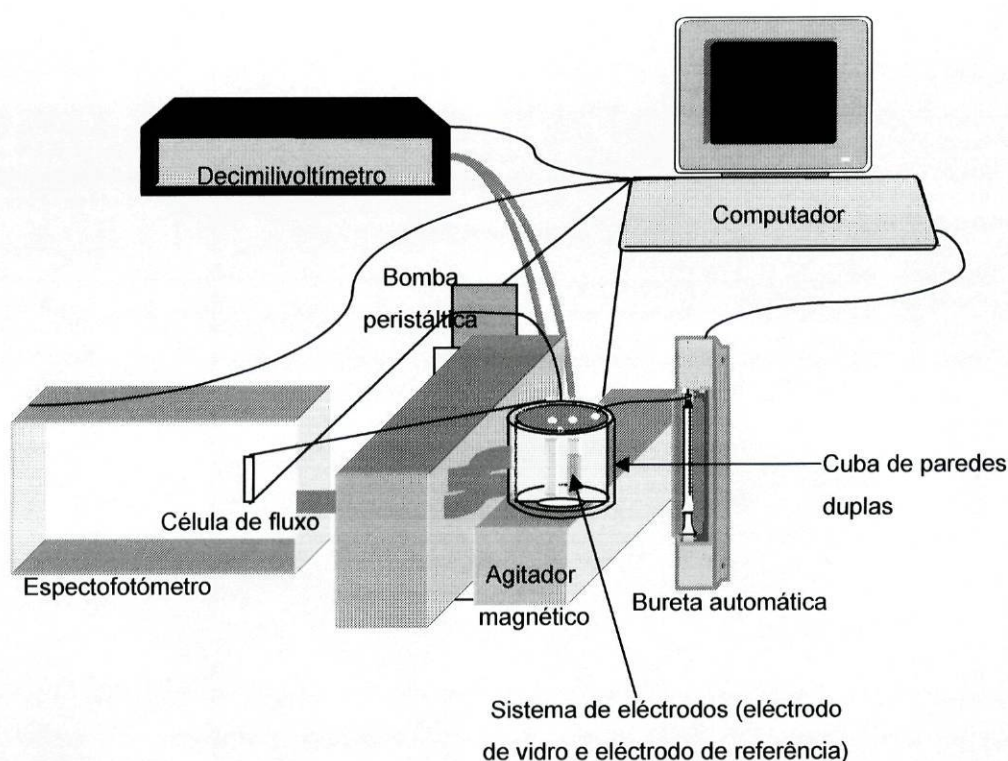


Figura 3.4: Representação esquemática do sistema automático de titulação em fluxo.

As soluções de diclofenac (aproximadamente 40 μM) e clonixina (aproximadamente 30 μM) com força iónica ajustada a 0,1 M com NaCl foram, respectivamente, alcalinizadas e acidificadas, pela adição de quantidades vestigiais de ácido forte (HCl 30%) ou base forte (NaOH 50%), de modo a que o volume adicionado fosse desprezável e não originasse uma variação significativa da concentração de fármaco.

O valor de pH foi medido num sistema potenciométrico, constituído por um eléctrodo de referência AgCl/Ag Orion 900029/4, contendo no compartimento interno a

solução Orion 90-00-02 saturada com AgCl e como solução externa o electrólito usado como ajustador de força iónica (NaCl 0,1 M), e um eléctrodo de vidro Russell SWL, sensível ao protão. As determinações de potencial foram realizadas utilizando um decimilivoltímetro Crison 2002 e uma microbureta automática Crison 2031, com um êmbolo de capacidade de 2,5 mL, ligados em série através de uma interface RS 232 C a um computador, que permitia o controlo das condições experimentais e aquisição dos dados.

A calibração do sistema potenciométrico utilizado foi efectuada pelo método de Gran [86], em termos da concentração do catião de hidrogénio ($[H^+]$), por titulação de uma solução de ácido forte (10^{-3} M HCl) com uma solução de base forte (0,02 M NaOH), sob corrente de azoto. A solução de HCl 10^{-3} M, $I = 0,1$ M, necessária para a calibração do eléctrodo de vidro, foi preparada por diluição rigorosa de uma solução padrão de HCl 0,10 M (Tritisol da Merck). A solução de hidróxido de sódio isenta de carbonato foi preparada aproveitando a baixa solubilidade do carbonato de sódio em soluções concentradas [87]. Assim, após o aquecimento da água à ebulição, seguido de arrefecimento em corrente de azoto, foi adicionada solução saturada de NaOH (cerca de 50%, m/m), através de uma seringa com filtro de $0,20\ \mu\text{M}$ de diâmetro de poro, para remover o precipitado de carbonato de cálcio. Deste modo, obtem-se uma solução de NaOH com concentração aproximadamente igual a 0,02 M, $I = 0,1$ M, a qual foi sempre mantida sob corrente de azoto. A solução de NaOH, assim preparada, foi padronizada por titulação potenciométrica com a solução de HCl 10^{-3} M, $I = 0,1$ M pelo método de Gran [86], procedimento já mencionado na calibração do eléctrodo de vidro.

Os ensaios foram realizados em atmosfera de azoto, numa cuba de paredes duplas, que permitia a manutenção da temperatura a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ pela circulação de água, no intervalo das duas paredes, proveniente de um banho termostatzado. Durante todo o ensaio, as soluções no interior da cuba eram mantidas em constante agitação por meio de um agitador magnético Crison 2038.

A constante de acidez do diclofenac foi obtida pela titulação de 25 mL de uma solução alcalinizada (com NaOH 50% isento de carbonato) desse fármaco (aproximadamente $40\ \mu\text{M}$, $I = 0,1$ M) com HCl (10^{-3} M, $I = 0,1$ M). Para a determinação das constantes de acidez da clonixina, o valor de $-\log [H^+]$ foi consecutivamente alterado pela titulação potenciométrica de 25 mL de uma solução acidificada (com HCl 30%) de fármaco (aproximadamente $30\ \mu\text{M}$, $I = 0,1$ M) com NaOH (0,02 M, $I = 0,1$ M). Ambos os titulantes (HCl e NaOH) foram adicionados por uma microbureta automática,

controlada por computador. Uma bomba peristáltica permitia a circulação da solução do vaso de titulação para o espectrofotómetro contendo no seu interior uma célula de fluxo de quartzo com 0,5 cm de percurso óptico, e deste voltava novamente para o vaso de titulação. Os espectros de absorvância das soluções, que continuamente passavam na célula de fluxo, foram obtidos num espectrofotómetro Hitachi U-2000 de duplo feixe, com compartimento de célula termostaticado a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, pelo mesmo banho que mantinha a temperatura no interior da cuba de paredes duplas. Todos os espectros, registados entre 220 e 400 nm, em intervalos de 2 nm e a uma velocidade de varrimento de 400 nm/min, foram traçados contra uma solução de NaCl 0,1 M.

As constantes de acidez foram calculadas com o programa pHab [50], usando dados obtidos de pelo menos três ensaios independentes.

Programa de controlo e aquisição dos dados: Para o controlo e aquisição de dados foi utilizado um programa elaborado em BASIC, desenvolvido no laboratório de Química-Física da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Para a execução das experiências, em condições optimizadas, tornou-se necessário fixar previamente o valor de certos parâmetros experimentais, designados no programa usado por [10]: volume da bureta, volume de amostra, concentração de titulante (M), adições fixas ou variáveis, incremento de adições, volume total de titulante, potencial final, número de leituras, tempo de espera após adição, adição inicial e filtro (%).

O comando adições fixas ou variáveis permite escolher entre os dois tipos diferentes de adição de titulante (solução de NaOH ou HCl), podendo esta ser efectuada por incrementos variáveis ao longo das determinações potenciométricas ou por incrementos constantes, fixando inicialmente o valor deste. No primeiro caso, após a adição de um volume inicial, previamente fixado, e da medição de potencial, os volumes a serem posteriormente adicionados são automaticamente calculados e inversamente proporcionais ao declive da curva, permitindo, desta forma, obter um maior número de pontos experimentais perto do ponto de equivalência. O cálculo do volume a debitar pode ser controlado pela instrução incremento das adições. O tempo de espera, após adição do titulante, fixa o intervalo de tempo que mediará entre a adição do titulante e o instante em que os valores de potencial passam a ser medidos.

A representação gráfica da curva de titulação pode ser visualizada e acompanhada no monitor do computador. Quando a titulação termina, o programa

permite o cálculo do volume equivalente pelo método da primeira e da segunda derivadas e, ainda, a sua representação gráfica.

Detecção da presença de carbonato na solução de hidróxido de sódio: As soluções de hidróxido de sódio apresentam uma forte tendência para ficarem carbonatadas. Mesmo quando correctamente preparadas, manipuladas e conservadas, a carbonatação das soluções ocorre com frequência, o que conduz a erros decorrentes do uso de um titulante constituído por uma mistura de bases (OH^- e CO_3^{2-}) de forças diferentes. Esta situação justificou o controlo sistemático da solução de hidróxido de sódio usada em cada experiência.

A utilização de uma curva de titulação, $E=f(V)$ (potencial em função do volume de titulante), não constitui o processo mais adequado para essa verificação, dado que não permite visualizar o ponto de equivalência correspondente à presença de vestígios de carbonato. O recurso à representação da primeira derivada da função $E=f(V)$ facilita a detecção da carbonatação mesmo quando esta é pouco extensa. Deste modo, no caso da solução se encontrar carbonatada, a curva correspondente à primeira derivada apresentará além do pico máximo, correspondente ao volume equivalente da base mais forte, um outro pico correspondente ao volume equivalente da titulação do carbonato. É de notar que quando o objectivo é verificar a presença de carbonato, torna-se necessário obter muitos valores de potencial junto ao ponto de equivalência, o que é conseguido realizando-se uma titulação com incrementos de volume variáveis.

Calibração do eléctrodo de vidro: O programa usado para a calibração do eléctrodo sensível ao protão permite a padronização da base por tratamento dos resultados da titulação de uma solução padrão de ácido forte (ácido clorídrico) com uma solução de base forte (hidróxido de sódio). Os resultados experimentais obtidos foram tratados por um programa de regressão linear escrito em QBASIC já existente no laboratório de Química-Física da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, que permite o cálculo do volume equivalente pelo método de Gran [86] e adicionalmente, a aplicação da equação de Nernst modificada possibilita a obtenção dos parâmetros de calibração do eléctrodo, nomeadamente a ordenada na origem e o declive da resposta do eléctrodo.

Na calibração do sistema por titulação ácido forte/base forte, definem-se as leituras do decimilivoltímetro em termos de $-\log [\text{H}^+]$ [47, 88]. Neste trabalho o eléctrodo de vidro foi calibrado em termos da concentração de H^+ , num meio com

força iónica ajustada a 0,1 M. Nesta metodologia de determinação das constantes de acidez, o termo pH referir-se-á a $-\log [H^+]$.

Programa de cálculo das constantes de acidez por espectrofotometria: Os resultados obtidos por espectrofotometria de ultravioleta/visível foram tratados com o programa pHab, que procede do programa Hyperquad pela remoção das partes relevantes apenas para os dados potenciométricos e pelo desenvolvimento de um novo modelo para o ficheiro dos dados espectrofotométricos [50]. Os comprimentos de onda seleccionados para os cálculos das constantes de equilíbrio corresponderam aos comprimentos de onda onde ocorria uma absorvância máxima do espectro das espécies, pois estes fornecem uma maior informação acerca da concentração dessas espécies. De facto, se se escolher uma zona espectral onde um elevado número de espécies absorventes coexistam, ou onde as absorvidades molares de duas ou mais espécies são interdependentes, a informação obtida vai ser reduzida pois os parâmetros vão estar relacionados [50].

Os resultados finais são acompanhados por um conjunto de parâmetros estatísticos, que permitem avaliar a qualidade do ajuste não linear obtido aos dados experimentais (Abs *versus* pH), nomeadamente o desvio padrão associado a cada uma das constantes refinadas e o desvio padrão dos valores de absorvância.

3.3.3. Determinação do coeficiente de partição

3.3.3.1. Determinação do coeficiente de partição por espectrofotometria derivativa

Em lipossomas de EPC: Os coeficientes de partição foram determinados a um valor de pH igual a 7,4 para todos os AINEs estudados. Adicionalmente, também se determinou o valor de K_p a valores de pH de 3,0 e 10,3 para os anti-inflamatórios diclofenac e clonixina. Nos estudos realizados a um valor de pH igual a 7,4, utilizou-se o tampão hepes (10 mM), a pH 3,0 foi usado o tampão constituído por ácido clorídrico (34,6 mM) e glicina (50 mM) e a pH 10,3 foi usado o tampão composto por hidróxido de sódio (43,2 mM) e ácido bórico (50 mM). Nos tampões com valores de pH iguais a 3,0 e 10,3 o valor de pH final foi ajustado num medidor de pH da marca Metrohm Herisau, modelo E 520, pela adição de base forte (NaOH) ou ácido forte (HCl). A força

iónica (*I*) dos três tampões utilizados foi ajustada a 0,1 M pela adição do electrólito NaCl.

Para a determinação do K_p , foram preparadas duas séries de amostras, uma série apresentava concentrações crescentes de EPC (0 a aproximadamente 1200 μM) e sem adição de fármaco, denominada brancos, e a outra apresentava as mesmas concentrações de EPC e uma concentração fixa de diclofenac (40 μM), clonixina (30 μM), etodolac (60 μM), indoprofeno (40 μM), piroxicam (30 μM) ou tenoxicam (30 μM). A concentração de cada anti-inflamatório, usada para a determinação do coeficiente de partição, encontrava-se dentro dos limites de concentrações onde se verificava a lei de Lambert-Beer.

As suspensões, assim preparadas, eram agitadas em vórtice, seguida de incubação à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, durante 30 min, para garantir o total estabelecimento do equilíbrio dos fármacos entre as pseudo-fases aquosa e lipídica.

Os espectros de absorvância, registados entre 200 e 500 nm, em intervalos de 1 nm, foram obtidos num espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 45 UV/Vis, com compartimento de célula termostaticado a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, utilizando células de quartzo de 1 cm de percurso óptico e a uma velocidade de varrimento de 480 nm/min. Os espectros das amostras e dos brancos foram traçados contra as soluções tampão usadas nas diferentes determinações de K_p .

A segunda e terceira derivada dos espectros de absorção, após subtração da intensidade de absorvância observada para os brancos, foram calculadas matematicamente por um programa computacional (Origin 6.1[®]), com regularização ("smoothing") dos espectros derivados.

Em lipossomas de EPC com colesterol: As condições experimentais para a determinação do coeficiente de partição dos AINEs diclofenac e clonixina em LUVs contendo colesterol na sua constituição foram semelhantes às descritas para a determinação deste mesmo parâmetro em lipossomas compostos apenas por EPC, a um valor de pH igual a 7,4. No entanto, para a realização deste estudo, foi necessária a incorporação de colesterol nos lipossomas de EPC. Assim, na preparação de lipossomas, descrita no capítulo 2, só após a adição de colesterol, dissolvido em metanol, na percentagem desejada (10% ou 40%) à solução de EPC, é que se procedia à evaporação dos solventes orgânicos para formar o filme lipídico. O restante procedimento foi executado como anteriormente referido (capítulo 2).

A concentração final de colesterol foi determinada espectrofotometricamente por um teste colorimétrico enzimático, num aparelho COBAS MIRA, pela utilização de um sistema de reagentes (ABX Diagnostics Cholesterol) destinado à determinação quantitativa do colesterol. O método baseia-se na acção da enzima colesterol oxidase sobre as moléculas de colesterol, em presença de oxigénio, dando origem ao 4-colestano-3-ona e a peróxido de hidrogénio. Este, por acção da peroxidase, é decomposto a H^+ e a água. O H^+ resultante reage com a 4-aminoantipirina, que na presença de fenol, dá origem a um derivado da quinoneimina de cor vermelha. A intensidade da cor está directamente relacionada com a concentração de colesterol e é medida a 500 nm.

3.3.3.2. Determinação do coeficiente de partição por avaliação do potencial-zeta

O coeficiente de partição dos AINEs diclofenac e clonixina foram determinados, a um valor de pH igual a 7,4, pela determinação dos valores de potencial-zeta por estudos de microelectroforese.

Foi preparada uma série de amostras que apresentava concentrações crescentes de fármaco (0 a 500 μM) e uma concentração fixa de lípido (400 μM). Após preparação, as amostras foram agitadas em vórtice. Ultrapassado o período de incubação de 30 min à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, foram efectuadas as medidas de potencial-zeta no mesmo equipamento e condições experimentais descritos no capítulo 2.

3.3.3.3. Determinação do coeficiente de partição por desactivação de fluorescência

A determinação do coeficiente de partição foi efectuada com a sonda 2-AS para os AINEs diclofenac e clonixina e com a sonda 12-AS para os oxicamos.

Neste ensaio, após a preparação dos LUVs de acordo com o procedimento experimental descrito no capítulo 2, foi adicionada a sonda de fluorescência (2-AS ou 12-AS) dissolvida em etanol. Esta adição foi efectuada em volumes de 10 μL , com agitação suave, numa quantidade tal que a razão lípido (3 mM):sonda (30 μM) seja de

100:1, e com uma concentração máxima de etanol nunca superior a 2%, sendo que para esta mesma percentagem está descrito que não há qualquer alteração na estrutura da membrana [89-91]. Seguiu-se uma incubação de 30 min à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, para promover a incorporação total da sonda na bicamada lipídica [20].

Para a preparação das amostras usadas na determinação do coeficiente de partição, foram adicionadas aos lipossomas marcados com a sonda 2-AS ou 12-AS soluções tamponadas (hepes: 10 mM, $I = 0,1$ M, pH 7,4) dos AINEs estudados (diclofenac, clonixina, tenoxicam e piroxicam). O intervalo final de concentrações de EPC foi de 80 a 900 μ M. Para cada concentração de EPC, os AINEs foram adicionados em intervalos de concentrações finais de 0 a 500 μ M para o diclofenac e clonixina, e de 0 a 50 μ M para os oxicamos. As suspensões resultantes foram agitadas em vórtice e incubadas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz durante 30 min.

As determinações de intensidade de fluorescência foram feitas num espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS 50B equipado com células de 1 cm de percurso óptico, termostatzadas a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. O comprimento de onda de excitação usado foi de 384 nm e o comprimento de onda de emissão foi de 451 nm para a sonda 2-AS e de 446 nm para a sonda 12-AS. A largura das fendas variou entre 2,5 e 6,5, de forma a situar os valores máximos das leituras dentro do limite máximo de registo do aparelho.

Para as determinações espectrofotométricas, necessárias para a correcção dos valores de intensidade de fluorescência medidos, foi utilizado um espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 45 UV/Vis com compartimento de célula termostatzado e células de quartzo com 1 cm de percurso óptico.

3.3.4. Determinação da localização dos AINEs

O procedimento experimental para a realização de estudos de localização dos AINEs na bicamada lipídica foi muito semelhante ao referido para a determinação do K_p por desactivação de fluorescência. No entanto, nos estudos de localização foram usadas as quatro sondas *n*-AS. Assim, diferentes suspensões de LUVs foram marcadas com as sondas 2-AS, 6-AS, 9-AS e 12-AS, de acordo com o descrito na parte experimental da técnica de desactivação de fluorescência para a determinação do valor de K_p .

Para os estudos de localização foi preparada uma série de amostras com concentração de lípido constante (aproximadamente 500 μM) e concentrações crescentes de AINEs (de 0 a 500 μM para o diclofenac e clonixina, de 0 a 50 μM para o piroxicam e tenoxicam, de 0 a 759 μM para o etodolac e de 0 a 463 μM para o indoprofeno), para cada uma das suspensões lipídicas marcadas com uma das sondas referidas.

As amostras resultantes foram agitadas em vórtice e incubadas no escuro durante 30 min, à temperatura ambiente, antes de se proceder às leituras espectrofluorimétricas, nas mesmas condições experimentais e no mesmo espectrofluorímetro referido no procedimento experimental da técnica de desactivação de fluorescência para a determinação do valor de K_p . O comprimento de onda de excitação usado foi de 384 nm e o comprimento de onda de emissão de 451 nm para a sonda 6-AS e de 446 nm para a sonda 9-AS.

Os valores de intensidade de fluorescência foram também corrigidos para a absorvância do desactivador (AINE) no comprimento de onda de excitação [69], de acordo com o descrito no método de determinação de K_p por desactivação de fluorescência.

3.3.5. Avaliação dos efeitos dos AINEs a nível membranar

3.3.5.1. Determinação do diâmetro e potencial-zeta da membrana

Os valores de potencial-zeta (ζ) e de diâmetro dos lipossomas de EPC, na presença ou na ausência de concentrações crescentes de fármaco, foram determinados a valores de pH iguais a 7,4 (tampão hepes: 10 mM, $I = 0,1$ M) e a 3,0 (tampão constituído por 34,6 mM de ácido clorídrico e 50 mM de glicina, com força iónica ajustada a 0,1 M), a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Para estudar a influência da interacção dos fármacos nas propriedades electrostáticas e no tamanho de lipossomas unilamelares de EPC (preparados do modo descrito no capítulo 2), foi preparada uma série de amostras que apresentava uma concentração fixa de EPC e concentrações crescentes de todos os AINEs em estudo, a um valor de pH igual a 7,4 e, adicionalmente, dos AINEs diclofenac e clonixina a um valor de pH igual a 3,0. A concentração de EPC usada foi igual a 400 μM e a concentração de clonixina e diclofenac presente nas amostras variou entre 0 e

500 μM e a do indoprofeno entre 0 e 694 μM , a um valor de pH igual a 7,4. A baixa solubilidade apresentada pelo tenoxicam, piroxicam e etodolac implicou o uso de soluções de dimetilsulfóxido:tampão hepes (1:99, V/V) para obter um intervalo de concentrações de 0 a 400 μM para o tenoxicam, 0 a 300 μM para o piroxicam e 0 a 634 μM para o etodolac. Com esta composição de solvente não ocorre danificação das membranas dos LUVs [92]. No entanto, foram preparadas e testadas soluções referência sem fármaco para assegurar que os valores de potencial-zeta e de tamanho não eram alterados pela presença do dimetilsulfóxido. Para as suspensões que apresentavam um valor de pH igual a 3,0, as concentrações de clonixina e diclofenac, nas amostras, variaram entre 0 e 350 μM . Após preparação das amostras, todas as suspensões foram agitadas em vórtice, seguida de incubação à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, durante 30 min.

As medidas de potencial-zeta e tamanho foram realizadas no equipamento e condições experimentais descritos no capítulo 2.

3.3.5.2. Determinação da fluidez membranar

O procedimento experimental, usado para a avaliação dos efeitos dos AINEs na fluidez membranar, foi semelhante ao definido para os estudos de localização de fármacos por fluorescência. As leituras de anisotropia de fluorescência de estado estacionário foram efectuadas com um tempo de integração de 50 s a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, no mesmo espectrofluorímetro, após a colocação automática dos polarizadores. O comprimento de onda de excitação foi fixado em 384 nm e o comprimento de onda de emissão em 451 nm para as sondas 2-AS e 6-AS e em 446 nm para as sondas 9-AS e 12-AS.

As medidas de anisotropia referidas foram obtidas conforme o descrito por Lacowitz *et al* [23]. Deste modo, a amostra foi excitada com luz polarizada verticalmente e as intensidades de fluorescência foram medidas com o polarizador de emissão orientado paralelamente ($I_{||}$) e perpendicularmente ($I_{\perp}$) ao polarizador de excitação. Estes valores foram usados para calcular a anisotropia de estado estacionário (r_{ss}), de acordo com a seguinte equação:

$$r_{ss} = \frac{I_{||} - GI_{\perp}}{I_{||} + 2GI_{\perp}} \quad (3.40)$$

em que G é um factor de correcção instrumental, dado pela razão das sensibilidades do sistema de detecção para a luz polarizada vertical e horizontalmente [23].

Falta ainda referir que as determinações dos valores da intensidade de fluorescência e de absorvância, necessários para a obtenção dos valores de anisotropia corrigidos, foram realizadas, respectivamente, no mesmo espectrofluorímetro e espectrofotómetro anteriormente referidos neste tipo de estudos.

3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1. Determinação espectrofométrica das constantes de acidez

A determinação das constantes de acidez foi efectuada por titulação espectrofométrica e não por titulação potenciométrica, devido à baixa solubilidade apresentada pelos AINEs diclofenac e clonixina em solução aquosa. Com efeito, a espectrofotometria pode ser utilizada para substâncias pouco solúveis em solução aquosa [45]. No entanto, como esta técnica se baseia na observação de mudanças espectrais ao longo de um intervalo de pH, foi avaliado se tais alterações se verificavam. Pela observação da Figura 3.5, é possível observar que ocorrem variações nos espectros de absorção da clonixina e do diclofenac a diferentes valores de pH. Contudo, enquanto que para a clonixina essas variações ocorrem em todo o intervalo de pH testado, para o diclofenac não se verificou uma diferença significativa nos seus espectros de absorção obtidos nos valores de pH 6 e 12. Contudo, se se observar a estrutura química do diclofenac (pág. 63 do capítulo 1), é possível visualizar a presença de um ácido carboxílico na sua estrutura, o que indicia que a sua constante de acidez deva apresentar um valor significativamente menor que 6. Deste modo, tornou-se possível a utilização do método espectrofotométrico para a determinação das constantes de acidez da clonixina e do diclofenac, uma vez que a protonação/desprotonação de um ou outro grupo funcional destes compostos, pela variação do valor de pH, resultou em alterações espectrais.

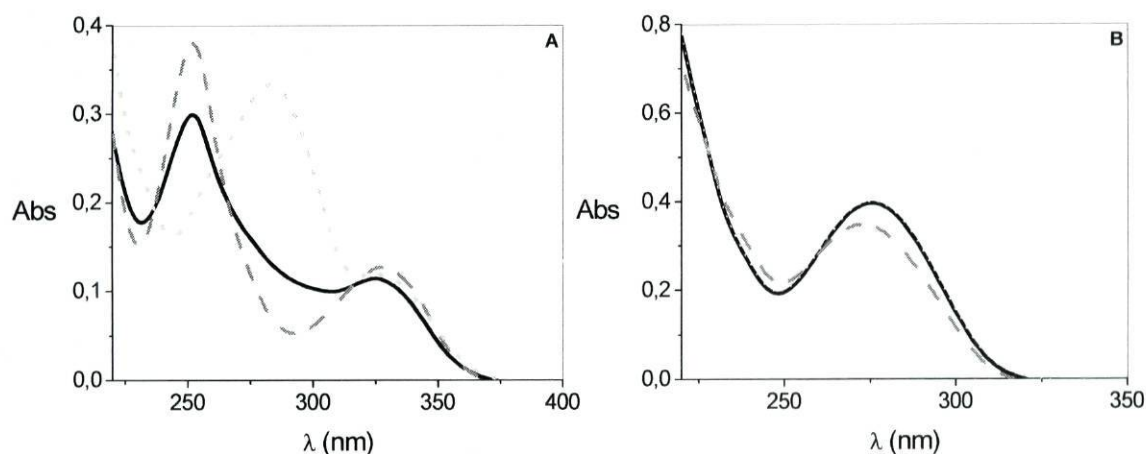


Figura 3.5: Espectros de absorção da clonixina (A; aproximadamente $30 \mu\text{M}$) e do diclofenac (B; aproximadamente $40 \mu\text{M}$), em solução aquosa com força iónica ajustada a $0,1 \text{ M}$ com NaCl, a diferentes valores de pH: (---) 2; (—) 6; (·····) 12.

Comummente, no laboratório as determinações espectrofotométricas das constantes de acidez são realizadas a partir da titulação de uma solução ácida do composto em estudo com NaOH ($0,02 \text{ M}$). No entanto, não foi possível usar este procedimento para o diclofenac, uma vez que se verificou que este AINE, em presença de luz, era instável em meio ácido. De facto, observou-se uma diminuição da absorvância da solução acidificada de diclofenac (no seu comprimento de onda de máxima absorção) ao longo do tempo, no sistema de fluxo, sem a adição de qualquer outro reagente (Figura 3.6 A). Contudo, se se adicionasse um volume desprezável, mas suficiente para provocar uma alteração significativa do valor de pH do meio (para valores de pH alcalino), de uma solução de base forte (NaOH 50%), quando a absorvância era próxima de zero, havia um aumento considerável da absorvância, que se mantinha praticamente constante ao longo do tempo. Este comportamento pode ser visualizado na Figura 3.6 B. Todavia, tal decréscimo da absorvância ao longo do tempo não se verificava se a mesma solução ácida de diclofenac fosse colocada numa célula no interior do mesmo espectrofotómetro, ao abrigo da luz (Figura 3.6 A).

Para minimizar, tanto quanto possível, o efeito relativo ao decréscimo da absorvância da solução acidificada de diclofenac, a determinação da constante de acidez foi efectuada a partir da titulação de uma solução alcalinizada de diclofenac com HCl (titrisol 10^{-3} M), ao abrigo da luz.

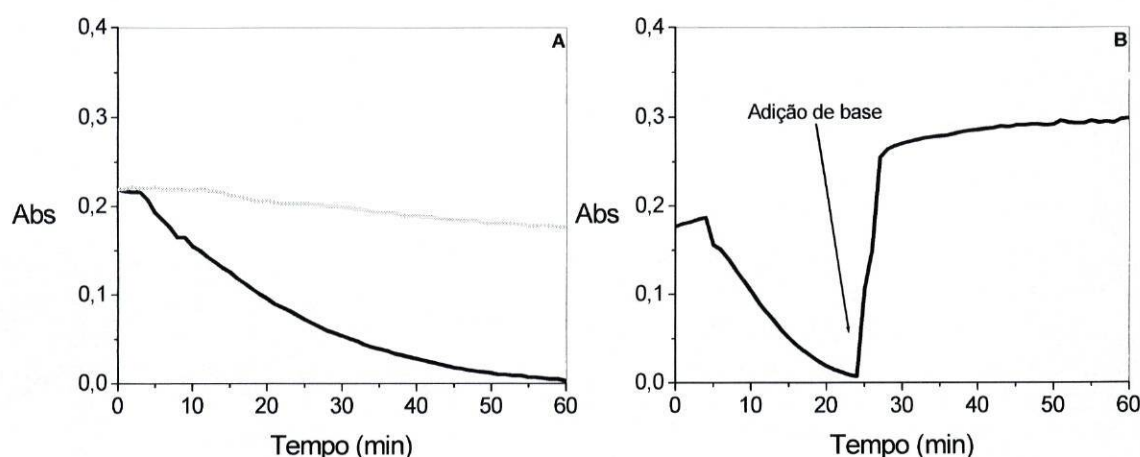


Figura 3.6: Valores de absorvância, a 272 nm, ao longo do tempo, de uma solução acidificada de diclofenac: (A) medidos (—) ou não (---) no sistema de fluxo; e (B) medidos após adição de NaOH 50% à solução de diclofenac, no sistema de fluxo usado para determinação das constantes de acidez.

O diclofenac apresenta na sua estrutura molecular um grupo carboxílico, que sofre desprotonação a valores de pH acima da sua constante de acidez, sendo o responsável pelas características de acidez apresentadas por este anti-inflamatório. Deste modo, sendo o diclofenac um anti-inflamatório com propriedades de ácido fraco, o seu equilíbrio de protonação pode ser traduzido pela equação química apresentada na Figura 3.7.

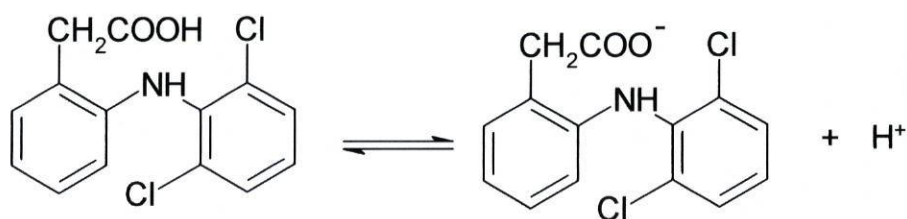


Figura 3.7: Equilíbrio de protonação do diclofenac em solução aquosa.

A clonixina, além de apresentar um grupo carboxílico, possui também o grupo aminopiridinil. Por conseguinte, a clonixina pode existir em quatro formas protonadas em solução. Os equilíbrios de protonação propostos são apresentados na Figura 3.8, de uma forma semelhante ao apresentado para uma molécula estruturalmente similar, o ácido niflúmico [51]. Em solução aquosa, a espécie neutra existe numa percentagem

desprezível, em detrimento da espécie dipolar. Assim, a partir desta suposição, apenas três espécies protonadas são consideradas em solução: positiva, dipolar e negativa.

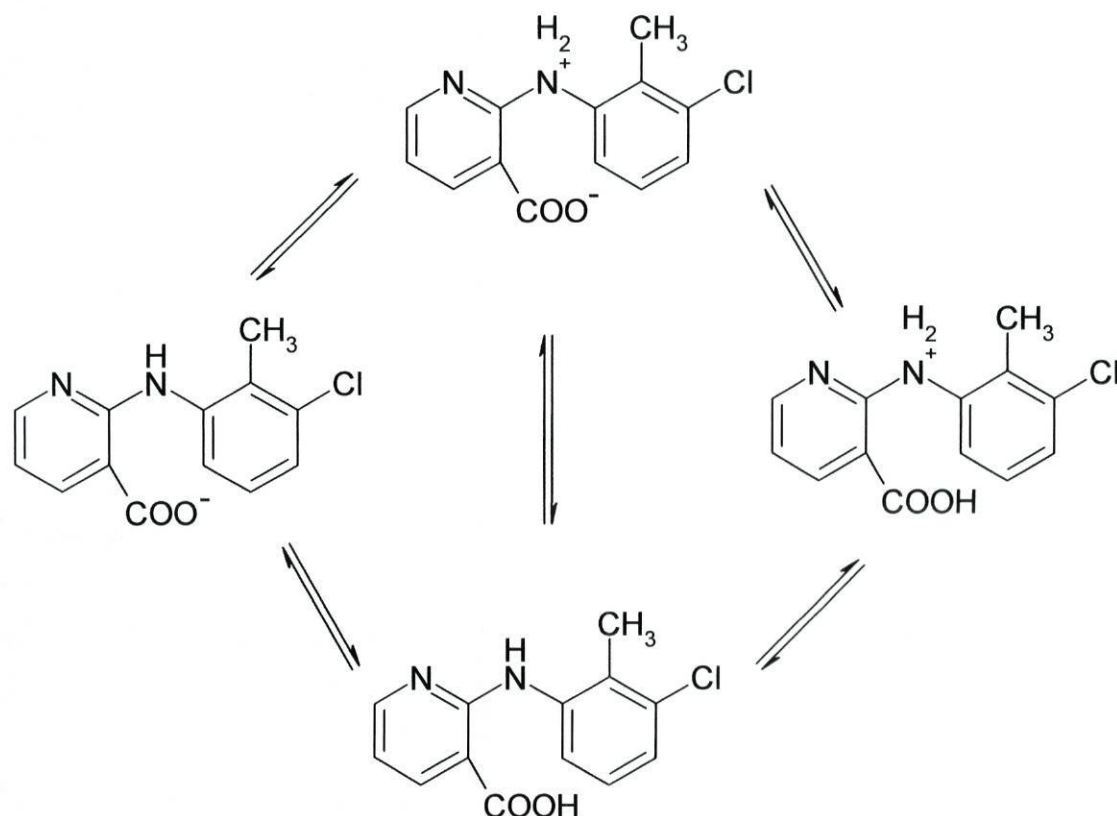


Figura 3.8: Equilíbrio de protonação da clonixina em solução aquosa.

Na Figura 3.9 é possível observar os espectros de absorção obtidos para o diclofenac e para a clonixina, com a variação do valor de pH, no sistema automático de titulação em fluxo usado para a determinação das constantes de acidez.

A variação espectral com o valor de pH, observada na Figura 3.9, permitiu o cálculo das constantes de acidez através do programa pHab [50]. Os valores de pK_a obtidos, em solução aquosa, à força iónica de 0,1 M e a 25°C, foram: $3,97 \pm 0,04$ para o diclofenac e $5,53 \pm 0,08$ e $2,20 \pm 0,04$ para a clonixina (média e erro associado a pelo menos três ensaios independentes).

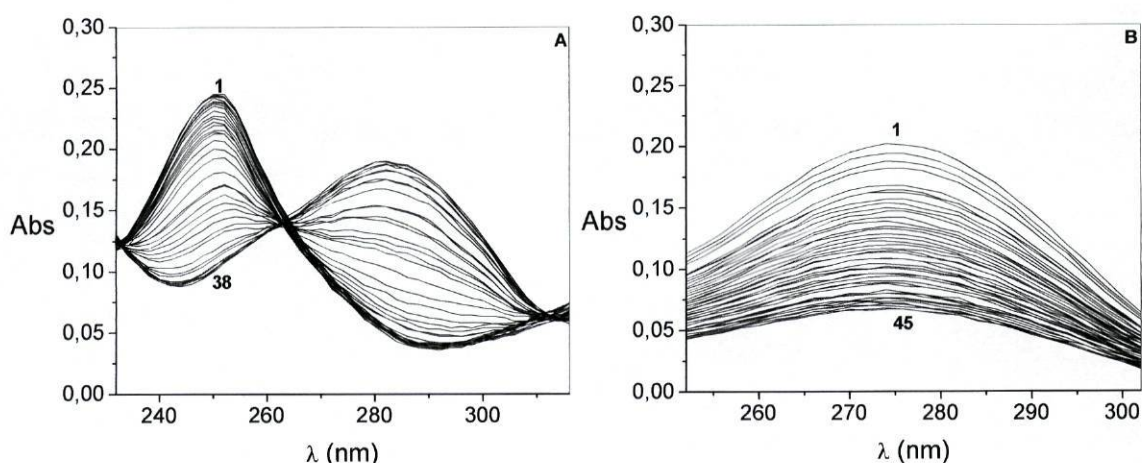


Figura 3.9: Espectros de absorção da clonixina (aproximadamente 30 μM ; A) e do diclofenac (aproximadamente 40 μM ; B) em solução aquosa com força iónica ajustada a 0,1 M com NaCl, a vários valores de pH: clonixina de 2,3 (1) a 9,2 (38) e para o diclofenac de 6,4 (1) a 2,4 (45).

O valor obtido para o diclofenac é semelhante ao descrito na literatura (3,99 a 25°C) [93], e está associado ao grupo carboxílico, que, como referido anteriormente, é o responsável pelas características de acidez apresentadas por este fármaco. A aplicação da equação de Hendersen-Hasselbalch revela que a pH fisiológico (pH igual a 7,4) o diclofenac existe numa percentagem de 99,9% na sua forma aniónica, enquanto que a pH 3,0 a forma neutra é a que predomina (90,7%).

Para a clonixina não foi encontrada, na literatura, qualquer referência às suas constantes de acidez. No entanto, os resultados de pK_{a1} e pK_{a2} obtidos assemelham-se aos apresentados para o ácido niflúmico ($4,44 \pm 0,03$ e $2,26 \pm 0,08$) [51]. Assim, ao valor de pH fisiológico (pH igual a 7,4), a clonixina existe predominantemente na forma negativa (98,7%), aumentando esta percentagem com o aumento do valor do pH, por exemplo 99,9% a um valor de pH igual a 10.

3.4.2. Determinação do coeficiente de partição

3.4.2.1. Determinação do coeficiente de partição por espectrofotometria derivativa

Em lipossomas de EPC: Os espectros de UV/Vis dos fármacos em estudo, na presença de concentrações crescentes de LUVs, apresentaram um aumento da linha

de base, à medida que a concentração de lípido aumentava, como se pode observar nos exemplos apresentados nas Figuras 3.10 e 3.11, obtidas em tampão hepes (pH igual a 7,4).

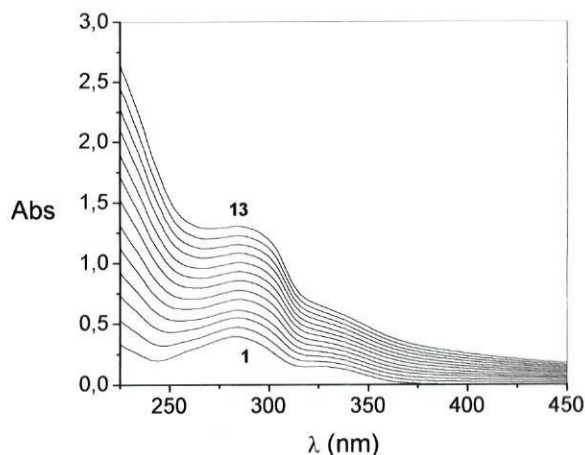


Figura 3.10: Espectros de absorvância da clonixina ($3,0 \times 10^{-5}$ M), a pH igual a 7,4, na presença de concentrações crescentes de LUVs de EPC. Concentrações de EPC (1-13): 0 M; $8,6 \times 10^{-5}$ M; $1,8 \times 10^{-4}$ M; $2,7 \times 10^{-4}$ M; $3,5 \times 10^{-4}$ M; $4,4 \times 10^{-4}$ M; $5,2 \times 10^{-4}$ M; $6,3 \times 10^{-4}$ M; $7,6 \times 10^{-4}$ M; $8,5 \times 10^{-4}$ M; $8,7 \times 10^{-4}$ M; $9,6 \times 10^{-4}$ M; $1,1 \times 10^{-3}$ M.

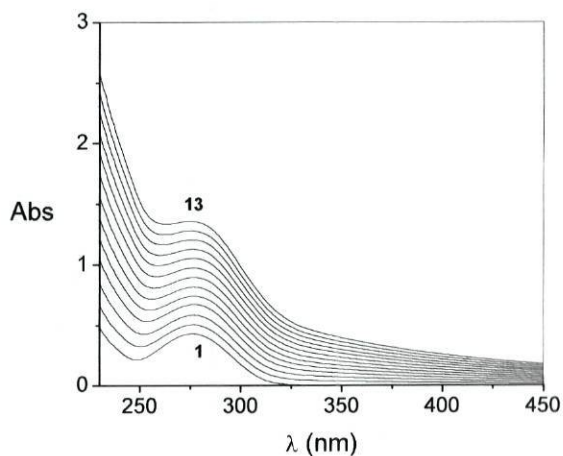


Figura 3.11: Espectros de absorvância do diclofenac ($4,0 \times 10^{-5}$ M), a pH igual a 7,4, na presença de concentrações crescentes de LUVs de EPC. Concentrações de EPC (1-13): 0 M; $8,2 \times 10^{-5}$ M; $1,6 \times 10^{-4}$ M; $2,6 \times 10^{-4}$ M; $3,4 \times 10^{-4}$ M; $4,2 \times 10^{-4}$ M; $5,5 \times 10^{-4}$ M; $6,2 \times 10^{-4}$ M; $7,1 \times 10^{-4}$ M; $8,1 \times 10^{-4}$ M; $8,9 \times 10^{-4}$ M; $9,6 \times 10^{-4}$ M; $1,1 \times 10^{-3}$ M.

O aumento da linha de base observada ocorreu devido, como já referido anteriormente, à dispersão de luz provocada pelas vesículas unilamelares (Figura 3.12).

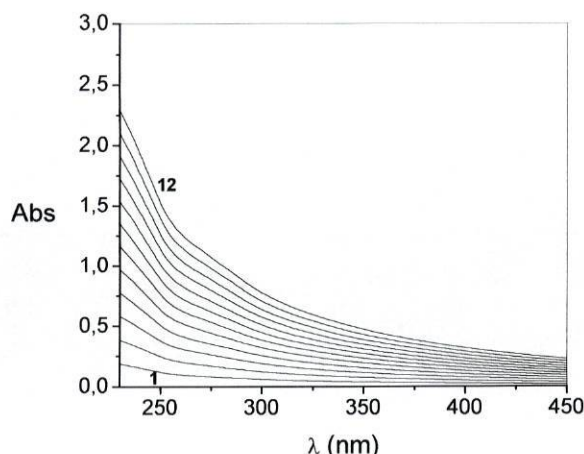


Figura 3.12: Espectros de absorvância dos brancos, a pH igual a 7,4, com concentrações de EPC (1-12): $8,6 \times 10^{-5}$ M; $1,8 \times 10^{-4}$ M; $2,7 \times 10^{-4}$ M; $3,5 \times 10^{-4}$ M; $4,4 \times 10^{-4}$ M; $5,2 \times 10^{-4}$ M; $6,3 \times 10^{-4}$ M; $7,6 \times 10^{-4}$ M; $8,5 \times 10^{-4}$ M; $8,7 \times 10^{-4}$ M; $9,6 \times 10^{-4}$ M; $1,1 \times 10^{-3}$ M.

Pela observação da Figura 3.12, é possível verificar que a dispersão de luz causada pelos LUVs aumenta à medida que se avança para menores comprimentos de onda, o que dificulta a completa eliminação da interferência causada pelos lipossomas por espectrofotometria derivativa. De facto, a derivação (segunda e terceira derivadas) dos espectros de ultravioleta/visível das amostras com concentrações crescentes de LUVs diminuiu, mas não conduziu à eliminação completa da interferência causada pela presença dos lipossomas (Figura 3.13). Tal facto deve-se a uma acentuada dispersão de Rayleigh por parte destas estruturas, que conduz a um aumento marcado da dispersão de luz à medida que se progride para menores comprimentos de onda [94].

Para ultrapassar o problema das interferências na determinação do valor de K_p lipossoma/solução aquosa de um fármaco por espectrofotometria derivativa, procedeu-se à subtracção dos brancos, antes de derivar os espectros de absorvância obtidos nas amostras com uma concentração fixa de fármaco. E, adicionalmente, utilizou-se os dados dos espectros das derivadas onde as interferências espectrais eram minimizadas, ou seja, onde o sinal correspondente aos brancos era igual ou

muito próximo de zero. As Figuras 3.14 e 3.15 apresentam os espectros presentes nas Figuras 3.10 e 3.11 após a subtração dos brancos.

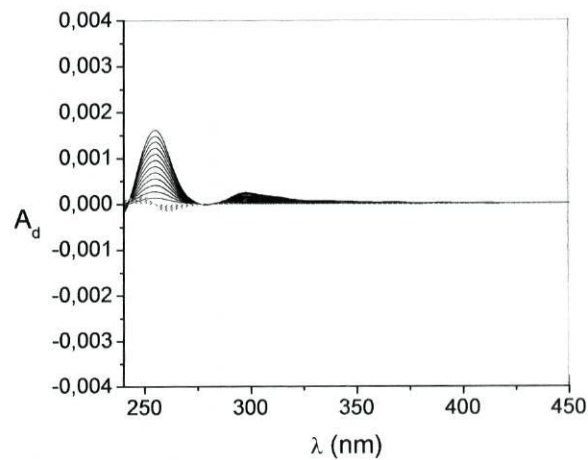


Figura 3.13: Segunda (linha a preto) e terceira (tracejado a cinzento) derivada dos espectros de absorvância dos brancos, a pH igual a 7,4, com concentrações iguais às referidas na legenda da Figura 3.12.

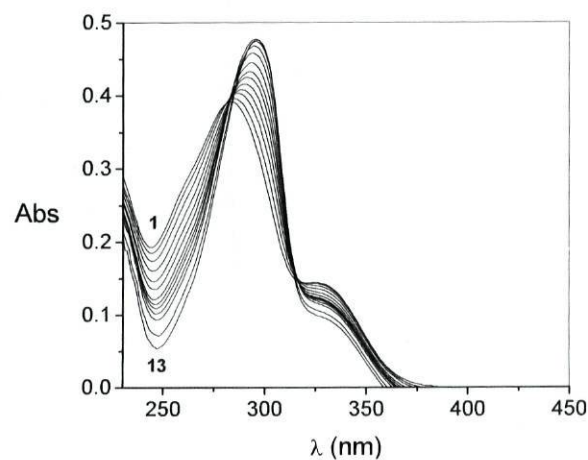


Figura 3.14: Espectro de absorvância da clonixina após subtração dos espectros correspondentes aos brancos, a pH igual a 7,4.

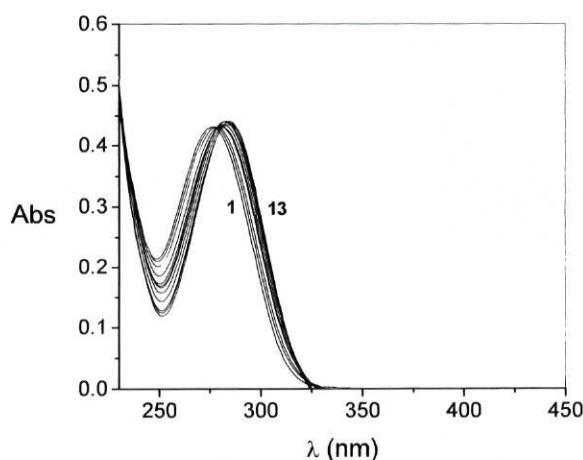


Figura 3.15: Espectro de absorvância do diclofenac após subtração dos espectros correspondentes aos brancos, a pH igual a 7,4.

A segunda e terceira derivadas dos espectros de absorvância, obtidos a um valor de pH igual a 7,4 dos AINEs clonixina, diclofenac, piroxicam e tenoxicam, apresentavam diminuição da intensidade de absorvância à medida que aumentava a concentração de lípido, o que significa que a absorvidade molar (ϵ) da substância diminui quando incorporada na membrana lipídica. Na Figura 3.16, é possível observar, como exemplo, a segunda e terceira derivadas dos espectros de absorvância obtidos para a clonixina e para o diclofenac. Observou-se, também, um deslocamento do $\lambda_{\text{máx}}$ para maiores comprimentos de onda (desvio batocrômico), característico da passagem de substâncias de um meio mais polar (solução aquosa) para um meio de menor polaridade (bicamada lipídica), e ainda a existência de pontos isobésticos. A observação destes pontos é importante pois são indicativos, por um lado da existência de pelo menos duas espécies espectralmente distintas na suspensão, uma em interacção com a membrana e a outra livre na solução aquosa e, por outro, da eliminação satisfatória do ruído causado pela dispersão de luz provocada pela presença dos lipossomas [16, 21].

Os coeficientes de partição dos anti-inflamatórios clonixina e diclofenac foram também determinados a valores de pH iguais a 3,0 e 10,3, para verificar como o valor do pH do meio influencia a partilha dos fármacos entre a fase aquosa e a membrana lipídica. Os espectros de UV/Vis da clonixina e do diclofenac a um valor de pH igual a 10,3, assim como as derivadas de ordem dois e três obtidas dos espectros de absorção após a subtração dos brancos, apresentaram comportamentos muito semelhantes aos observados a um valor de pH igual a 7,4. No entanto, a um valor de

pH igual a 3,0 isso não se verificou. De facto, os espectros de absorvância obtidos para os fármacos referidos (Figura 3.17 e 3.18), assim como as segundas e terceiras derivadas obtidas dos espectros de absorvância após a subtração dos brancos (Figura 3.19), apresentaram diferenças significativas quando comparados com os obtidos a um valor de pH igual a 7,4 (Figuras 3.10, 3.11 e 3.16).

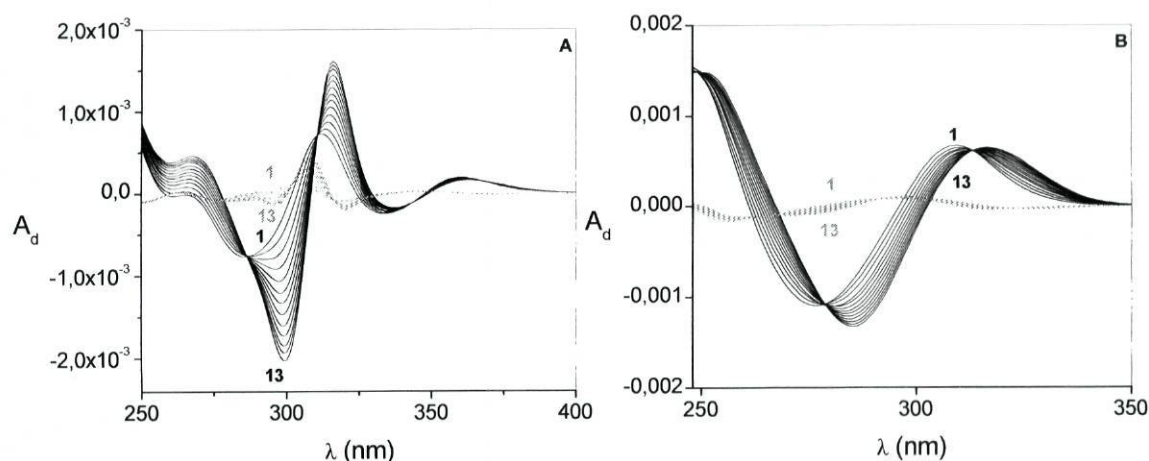


Figura 3.16: Segunda (linha a preto) e terceira (tracejado a cinzento) derivadas dos espectros de absorvância após subtração dos espectros correspondentes aos brancos, da clonixina (A) e do diclofenac (B), a pH igual a 7,4, na presença de concentrações crescentes de fosfolípido (EPC). Concentrações de EPC (1-13) iguais às referidas nas legendas das Figuras 3.10 e 3.11, para a clonixina e para o diclofenac, respectivamente.

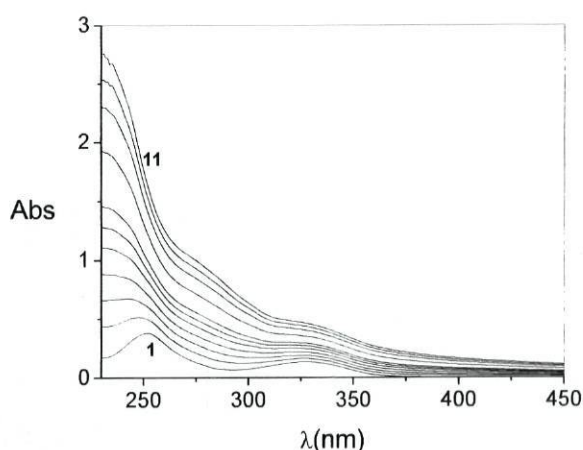


Figura 3.17: Espectros de absorvância da clonixina ($3,0 \times 10^{-5}$ M), a pH igual a 3,0, na presença de concentrações crescentes de LUVs de EPC. Concentrações de EPC (1-11): 0 M; $8,4 \times 10^{-5}$ M; $1,6 \times 10^{-4}$ M; $2,4 \times 10^{-4}$ M; $3,2 \times 10^{-4}$ M; $3,9 \times 10^{-4}$ M; $4,7 \times 10^{-4}$ M; $6,8 \times 10^{-4}$ M; $8,6 \times 10^{-4}$ M; $1,0 \times 10^{-3}$ M; $1,1 \times 10^{-3}$ M.

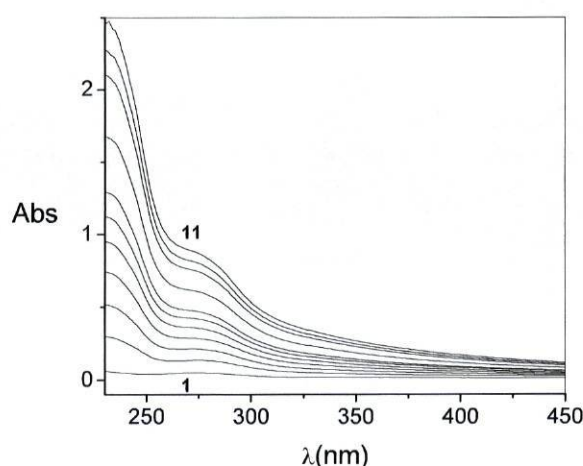


Figura 3.18: Espectros de absorvância do diclofenac ($4,0 \times 10^{-5}$ M), a pH igual a 3,0, na presença de concentrações crescentes de LUVs de EPC. Concentrações de EPC (1-11): 0 M; $7,3 \times 10^{-5}$ M; $1,5 \times 10^{-4}$ M; $2,3 \times 10^{-4}$ M; $3,2 \times 10^{-4}$ M; $4,0 \times 10^{-4}$ M; $5,1 \times 10^{-4}$ M; $7,9 \times 10^{-4}$ M; $8,9 \times 10^{-4}$ M; $9,8 \times 10^{-4}$ M; $1,2 \times 10^{-3}$ M.

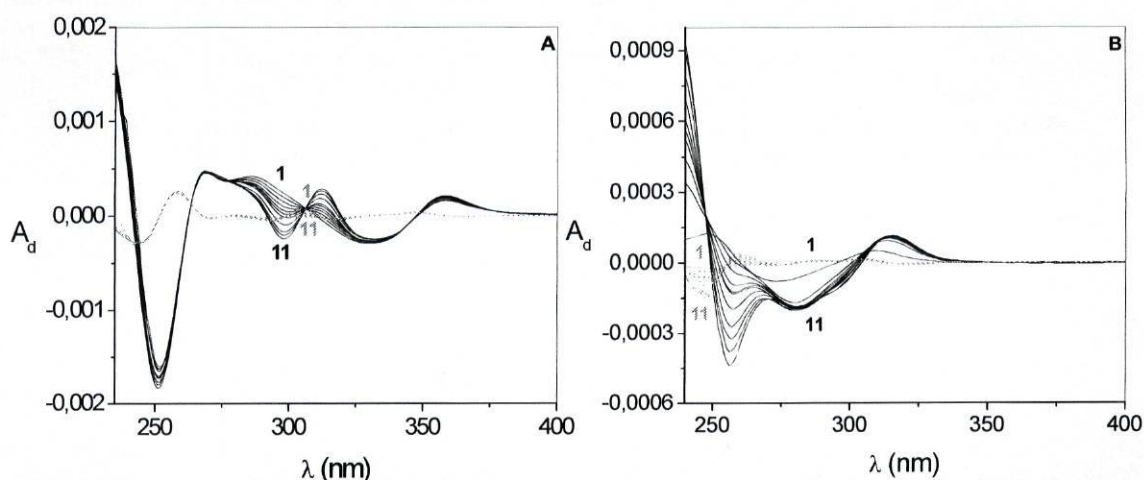


Figura 3.19: Segunda (linha a preto) e terceira (tracejado a cinzento) derivadas dos espectros de absorvância após subtração dos espectros correspondentes aos brancos, da clonixina (A) e do diclofenac (B), a pH igual a 3,0, na presença de concentrações crescentes de fosfolípido (EPC). Concentrações de EPC (1-11) iguais às referidas nas legendas das Figuras 3.17 e 3.18 para a clonixina e para o diclofenac, respectivamente.

A segunda e terceira derivadas dos espectros de absorvância após a subtração dos brancos a um valor de pH igual a 3,0 (Figura 3.19) apresentam os mesmos detalhes espectrais descritos a um valor de pH igual a 7,4, nomeadamente a diminuição da intensidade de absorvância à medida que aumenta a concentração do lípido, a existência de pontos isobésticos e um deslocamento do $\lambda_{\max}$ para maiores comprimentos de onda. Os coeficientes de partição foram, assim, determinados a

partir dos espectros da segunda e terceira derivadas, a comprimentos de onda onde as interferências espectrais estejam minimizadas, como já referido anteriormente.

A representação gráfica das derivadas das absorvâncias (A_d) em função das concentrações do lípido utilizado permitiu a determinação dos coeficientes de partição, pelo ajuste da equação 3.6 aos valores experimentais, usando um método de regressão não linear. Exemplos dos ajustes não lineares obtidos pelo programa computacional Origin 6.1[®] para os fármacos clonixina, diclofenac, piroxicam e tenoxicam, a um valor de pH igual a 7,4, podem ser observados na Figura 3.20.

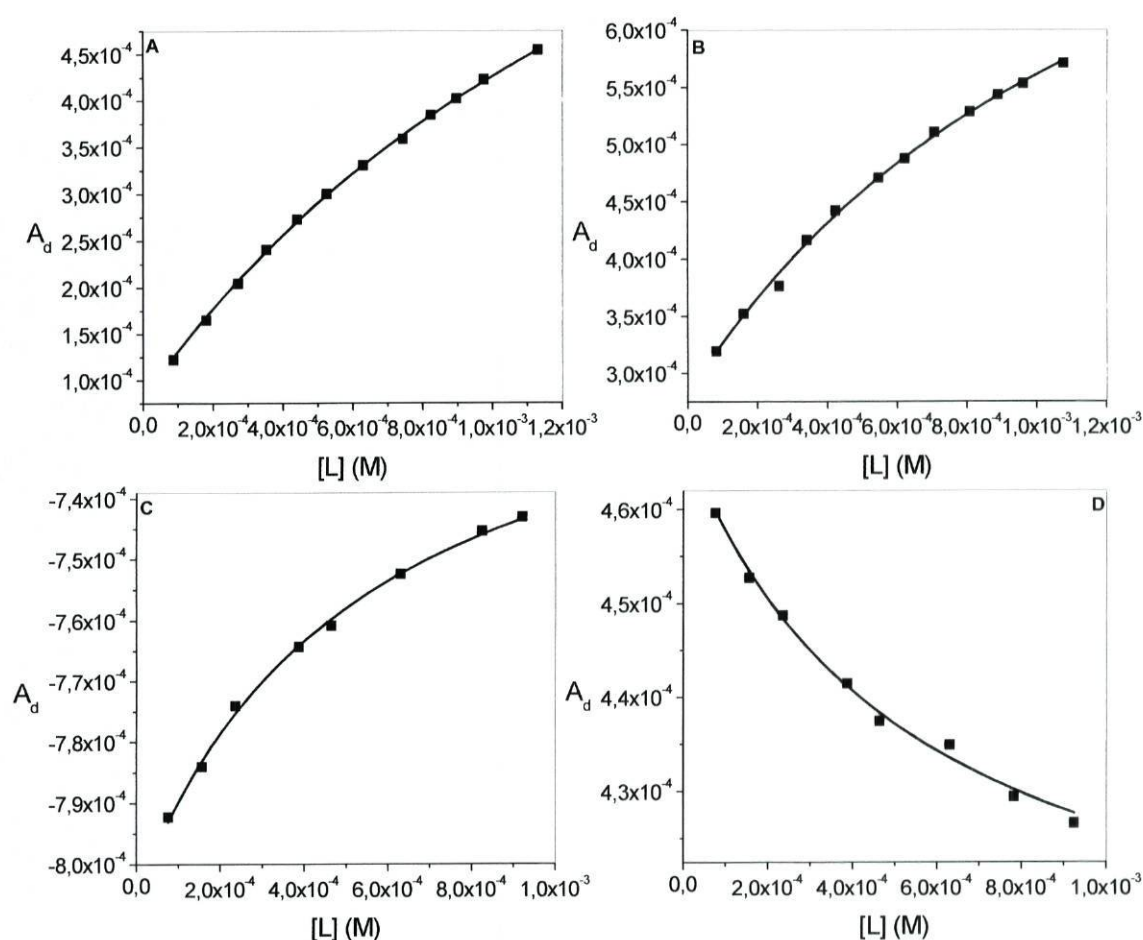


Figura 3.20: Representação gráfica da dependência dos valores da derivada da intensidade de absorvância com a concentração de EPC (iguais às referidas nas legendas das Figuras 3.10 e 3.11 (2-13), respectivamente, para a clonixina e diclofenac; para o piroxicam: $7,6 \times 10^{-5}$ M; $1,6 \times 10^{-4}$ M; $2,4 \times 10^{-4}$ M; $3,9 \times 10^{-4}$ M; $4,6 \times 10^{-4}$ M; $6,3 \times 10^{-4}$ M; $8,2 \times 10^{-4}$ M; $9,2 \times 10^{-4}$ M; e para o tenoxicam: $7,6 \times 10^{-5}$ M; $1,5 \times 10^{-4}$ M; $2,3 \times 10^{-4}$ M; $3,8 \times 10^{-4}$ M; $4,6 \times 10^{-4}$ M; $6,3 \times 10^{-4}$ M; $7,8 \times 10^{-4}$ M; $9,2 \times 10^{-4}$ M), a pH igual a 7,4. As linhas correspondem ao ajuste não linear do modelo matemático, expresso pela equação 3.6, para a clonixina (λ usado igual a 308 nm da 3^a derivada; A), diclofenac (λ usado igual a 322 nm da 2^a derivada; B), piroxicam (λ usado igual a 289 nm da 2^a derivada; C) e tenoxicam (λ usado igual a 272 nm da 2^a derivada; D).

Nas Figuras 3.21 e 3.22 apresentam-se os ajustes da mesma equação (3.6) aos dados experimentais obtidos a valores de pH iguais a 3,0 e 10,3, respectivamente, para a clonixina e diclofenac.

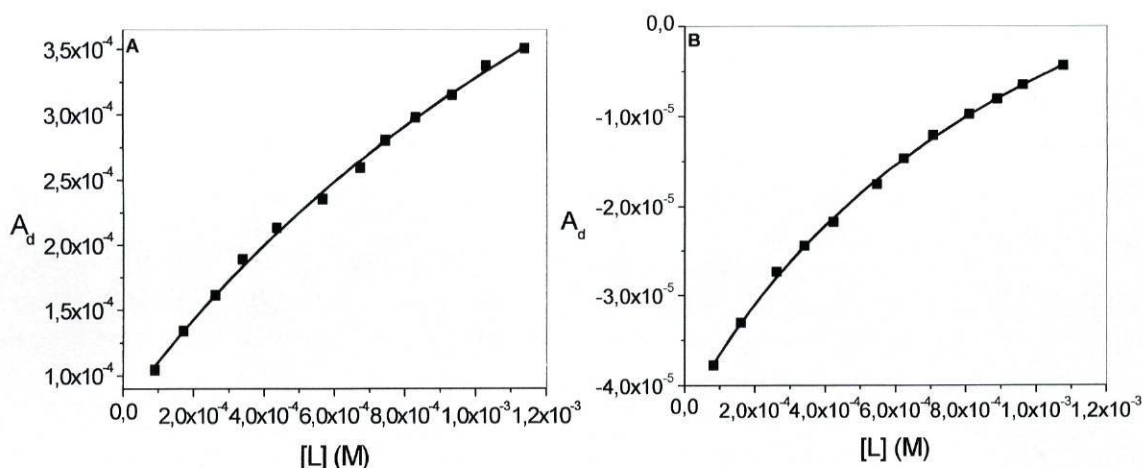


Figura 3.21: Representação gráfica da dependência dos valores da derivada da intensidade de absorvância com a concentração de EPC (clonixina: $9,0 \times 10^{-5}$ M; $1,7 \times 10^{-4}$ M; $2,6 \times 10^{-4}$ M; $3,4 \times 10^{-4}$ M; $4,4 \times 10^{-4}$ M; $5,7 \times 10^{-4}$ M; $6,7 \times 10^{-4}$ M; $7,4 \times 10^{-4}$ M; $8,3 \times 10^{-5}$ M; $9,3 \times 10^{-4}$ M; $1,0 \times 10^{-3}$ M; $1,1 \times 10^{-3}$ M, e diclofenac: $8,4 \times 10^{-5}$ M; $1,6 \times 10^{-4}$ M; $2,6 \times 10^{-4}$ M; $3,5 \times 10^{-4}$ M; $4,0 \times 10^{-4}$ M; $5,5 \times 10^{-4}$ M; $6,3 \times 10^{-4}$ M; $7,2 \times 10^{-4}$ M; $8,0 \times 10^{-5}$ M; $9,1 \times 10^{-4}$ M; $9,8 \times 10^{-4}$ M; $1,0 \times 10^{-3}$ M), a pH igual a 10,3. As linhas correspondem ao ajuste não linear do modelo matemático, expresso pela equação 3.6, para a clonixina (λ usado igual a 308 nm da 3ª derivada; A) e diclofenac (λ usado igual a 322 nm da 2ª derivada; B).

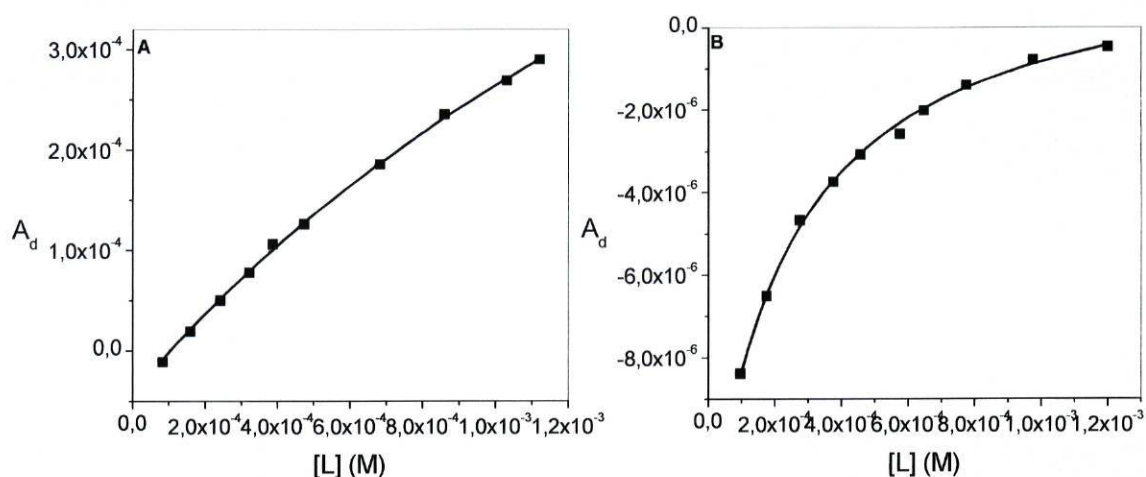


Figura 3.22: Representação gráfica da dependência dos valores da derivada da intensidade de absorvância com a concentração de EPC (clonixina e diclofenac iguais às referidas nas legendas das Figuras 3.17 e 3.18 (2-11), respectivamente), a pH igual a 3,0. As linhas correspondem ao ajuste não linear do modelo matemático, expresso pela equação 3.6, para a clonixina (λ usado igual a 312 nm da 2ª derivada; A) e diclofenac (λ usado igual a 257 nm da 3ª derivada; B).

Teoricamente, os valores de K_p podem ser calculados a partir dos valores de A_d a qualquer comprimento de onda. No entanto, de modo a aumentar a razão sinal/ruído os valores de A_d , para amostras heterogéneas, deverão ser obtidos para os valores de $\lambda_{\max}$ dos espectros de absorvância [13, 14], dado que na vizinhança dos máximos de absorvância pequenas incorrecções na reprodutibilidade dos comprimentos de onda não implicam grandes alterações nos valores de A_d [13]. Adicionalmente, como já referido anteriormente, deve ser garantido que nos comprimentos de onda seleccionados para o cálculo do valor de K_p , a dispersão de luz esteja minimizada ao máximo, especialmente para valores de comprimentos de onda pequenos, onde a dispersão é elevada. Assim, tendo em conta estes dois parâmetros, foram utilizados os λ presentes na Tabela 3.1 para a determinação do valor de K_p dos diferentes AINEs.

Tabela 3.1: Valores dos comprimentos de onda, λ , em nm, dos espectros de segunda e terceira derivadas, usados para o cálculo do K_p dos fármacos diclofenac, clonixina, piroxicam e tenoxicam.

Fármacos	λ (nm)	
	Espectros da segunda derivada	Espectros da terceira derivada
Diclofenac	287	271
	309	281
	322	317
Clonixina	274	295
	300	308
	316	320
Piroxicam	273	297
	289	329
	310	—
Tenoxicam	272	278
	289	300
	310	—

Os valores de K_p , adimensionais (divisão do valor de K_p expresso em M^{-1} por V_ϕ), são apresentados na Tabela 3.2 e correspondem à média com o desvio padrão

associado dos valores de K_p calculados a diferentes valores de comprimento de onda da segunda e da terceira derivadas, obtidos em três ensaios independentes.

Tabela 3.2: Valores de coeficientes de partição lipossoma/solução aquosa adimensionais (K_p), obtidos por espectrofotometria derivativa, para a clonixina, diclofenac, piroxicam, tenoxicam, etodolac e indoprofeno. Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão dos resultados obtidos em pelo menos três ensaios independentes.

Fármacos	pH	K_p
Diclofenac	3,0	26000 $\pm$ 3000
	7,4	1200 $\pm$ 100
	10,3	1100 $\pm$ 50
Clonixina	3,0	530 $\pm$ 100
	7,4	660 $\pm$ 100
	10,3	870 $\pm$ 50
Piroxicam	7,4	2700 $\pm$ 100
Tenoxicam	7,4	2300 $\pm$ 200
Etodolac	7,4	_____ *
Indoprofeno	7,4	_____ *

*não foi possível determinar um valor nas condições experimentais estabelecidas

Pela observação da Tabela 3.2, pode-se verificar que o diclofenac apresenta uma partição significativamente maior a um valor de pH igual 3,0 do que a valores de pH iguais a 7,4 ou 10,3. Esta maior partição, a um valor de pH igual a 3,0, está relacionada com a maior hidrofobicidade da forma neutra, a qual existe predominantemente ao valor de pH referido (90,7%). Contrariamente, a valores de pH iguais a 7,4 e 10,3 o fármaco está praticamente todo ionizado (99,9%) e, deste modo, os valores de K_p obtidos são idênticos e mais baixos devido à existência da carga negativa. Comportamento semelhante ao descrito foi observado para a indometacina e acetmetacina [16, 55]. No entanto, para a clonixina é possível verificar (Tabela 3.2) que

os valores de K_p obtidos não variaram significativamente com o valor de pH. De facto, como a clonixina se encontra ionizada no intervalo de pH compreendido entre 3,0 e 10,3, a hidrofobicidade das suas formas carregadas positivamente (86,3%, a um valor de pH igual a 3,0) ou negativamente (99,9%, a um valor de pH igual a 10,3) é semelhante e consequentemente a sua afinidade para as bicamadas lipídicas não varia dramaticamente. Contudo, o menor valor de K_p , obtido a um valor de pH igual a 3,0, deve estar relacionado com a repulsão electrostática entre as formas da clonixina carregadas positivamente e a superfície membranal também com carga positiva. Deste modo, a partição deve ser governada principalmente pela forma dipolar da clonixina (13,7%), presente em menor extensão na solução aquosa, a um valor de pH igual a 3,0.

A comparação dos valores de K_p obtidos para cada fármaco em estudo, a um valor de pH igual a 7,4, permite verificar que os AINEs piroxicam e tenoxicam apresentaram uma maior partição comparativamente ao diclofenac e clonixina. A maior partilha observada para os oxicamos está fundamentalmente relacionada com o facto destes fármacos serem iões dipolares estáveis ao valor de pH referido. Assim, como já referido, o diclofenac e a clonixina estão predominantemente carregados negativamente a um valor de pH igual a 7,4 e, consequentemente, apresentaram valores de K_p menores.

Não foi possível a determinação de um valor de K_p para o indoprofeno e para o etodolac, nas condições experimentais estabelecidas. Relativamente ao indoprofeno, esta impossibilidade pode dever-se ao facto de a um valor de pH igual a 7,4, o fármaco não interagir com os lipossomas (o que está concordante com os resultados obtidos em fluorimetria e na determinação do potencial-zeta, descritos posteriormente). Adicionalmente, esta explicação é corroborada pela presença na literatura de valores negativos de $\text{Log } P_{\text{oct}}$ (-0,38, determinados pelo sistema octanol/água) [95]. No entanto, para um valor de pH igual a 2, o indoprofeno já apresenta um valor positivo de $\text{Log } P_{\text{oct}}$, o que pode significar que a este valor de pH a partição na fase membranal é significativamente superior à obtida a um valor de pH igual a 7,4.

Quanto ao etodolac, a inexistência de um valor de partição lipossoma/solução aquosa na Tabela 3.2 poderá estar relacionada com a concentração usada deste AINE nestes ensaios. De facto, como se observará posteriormente no estudo fluorimétrico, só se obtém desactivação de fluorescência das sondas *n*-AS com concentrações

bastante superiores às usadas em espectrofotometria (60 μ M), o que poderá indicar que não deve existir uma partilha significativa no valor de concentração considerado.

Em lipossomas de EPC com colesterol: Neste estudo avaliou-se a interacção dos anti-inflamatórios conixina e diclofenac com lipossomas unilamelares de fosfatidilcolina da gema de ovo, possuindo na sua constituição colesterol em diferentes percentagens (aproximadamente 10 e 40%).

A segunda e terceira derivadas dos espectros de absorvância das suspensões de referência, contendo apenas as vesículas unilamelares com aproximadamente 10 ou 40% de colesterol (brancos), eliminaram parcialmente e de um modo muito semelhante à verificada na determinação do valor de K_p anteriormente apresentada a um valor de pH igual a 7,4, a dispersão de luz presente em todo o intervalo de comprimentos de onda utilizados. Assim, como no ensaio efectuado com lipossomas constituídos unicamente por EPC, também neste se procedeu à subtracção dos espectros das amostras aos espectros dos brancos e à derivação do espectro resultante. De facto, a subtracção dos brancos, por si só, não permite a eliminação absoluta da dispersão de luz interferente, apesar de serem preparados com as mesmas concentrações lipídicas. Deste modo, também nestes ensaios, o coeficiente de partição entre as vesículas lipossómicas e a solução aquosa foi calculado a partir dos valores da derivada da intensidade de absorvância obtidos em comprimentos de onda onde as interferências espectrais eram minimizadas ao máximo.

Os espectros de UV/Vis da clonixina e do diclofenac antes e após subtracção dos brancos, assim como as respectivas segundas e terceiras derivadas na presença de lipossomas unilamelares incluindo aproximadamente 10% de colesterol, a um valor de pH igual a 7,4, foram muito semelhantes aos observados no ensaio anterior, ao mesmo valor de pH, com bicamadas fosfolipídicas constituídas unicamente por EPC. Contudo, o mesmo não se pode verificar nos estudos em LUVs de EPC com aproximadamente 40% de colesterol. Com efeito, apesar dos espectros de absorção da clonixina e do diclofenac (Figura 3.23) não terem exibido diferenças visíveis relativamente aos obtidos em LUVs de EPC (Figuras 3.10 e 3.11), o mesmo não se verificou para os espectros obtidos após subtracção dos brancos. As diferenças obtidas entre os espectros após subtracção dos brancos em lipossomas contendo ou não aproximadamente 40% de colesterol podem ser observadas através da comparação dos espectros presentes na Figura 3.24 com os apresentados nas Figuras 3.14 e 3.15 para a clonixina e diclofenac, respectivamente.

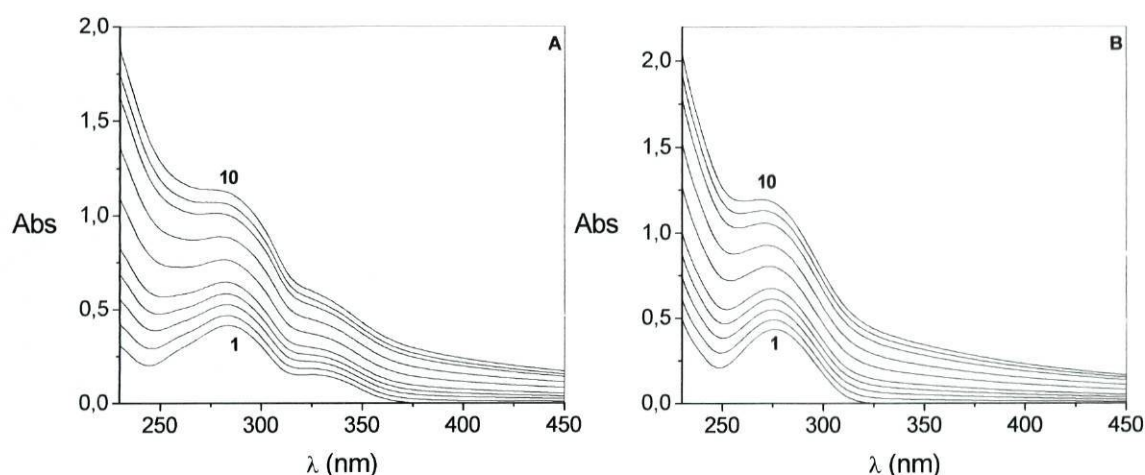


Figura 3.23: Espectros de absorvância da clonixina ($3,0 \times 10^{-5}$ M; A) e do diclofenac ($4,0 \times 10^{-5}$ M; B), a pH igual a 7,4, na presença de concentrações crescentes de LUVs de EPC com aproximadamente 40% de colesterol. Concentrações de lípido para A (1-10): 0 M; $6,2 \times 10^{-5}$ M; $1,2 \times 10^{-4}$ M; $1,9 \times 10^{-4}$ M; $2,5 \times 10^{-4}$ M; $3,8 \times 10^{-4}$ M; $5,1 \times 10^{-4}$ M; $6,6 \times 10^{-4}$ M; $7,2 \times 10^{-4}$ M; $7,9 \times 10^{-4}$ M, e para B (1-10): 0 M; $6,1 \times 10^{-5}$ M; $1,2 \times 10^{-4}$ M; $1,8 \times 10^{-4}$ M; $2,4 \times 10^{-4}$ M; $3,7 \times 10^{-4}$ M; $4,9 \times 10^{-4}$ M; $6,2 \times 10^{-4}$ M; $6,8 \times 10^{-4}$ M; $7,6 \times 10^{-4}$ M. A concentração de lípido apresentada corresponde à soma da concentração do fosfolípido e do colesterol.

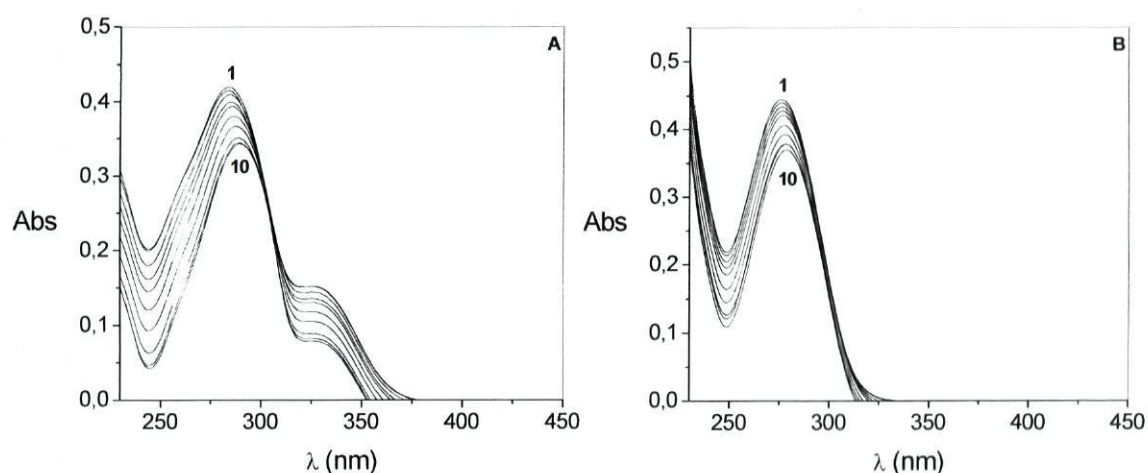


Figura 3.24: Espectro de absorvância após subtração dos espectros correspondentes aos brancos, a pH igual a 7,4, da clonixina (A) e do diclofenac (B).

Como consequência, as segundas e terceiras derivadas obtidas dos espectros após subtração dos brancos (Figura 3.25) também apresentaram algumas alterações relativamente às observadas nos ensaios com LUVs incorporando 10% de colesterol e

às verificadas nos estudos com bicamadas fosfolipídicas constituídas unicamente por EPC (Figura 3.16).

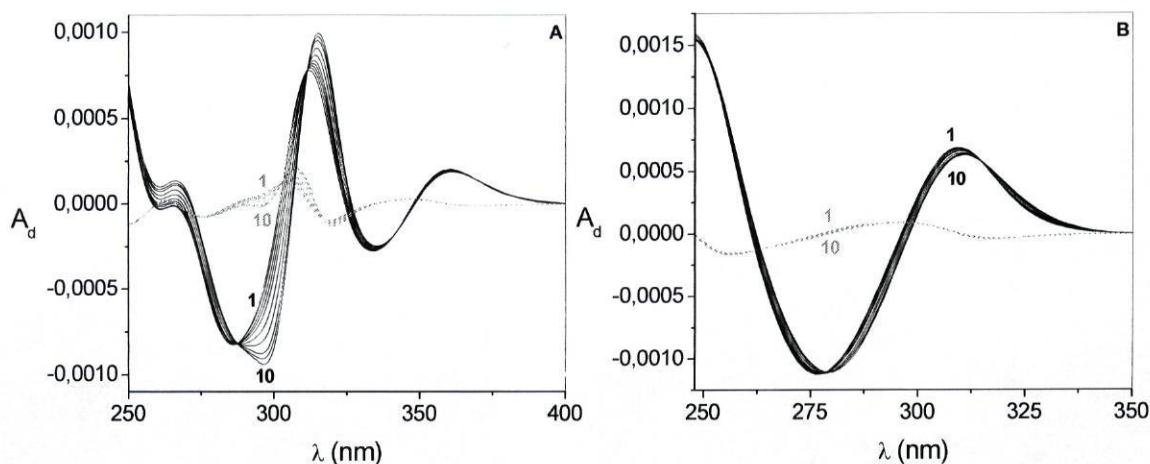


Figura 3.25: Segunda (linha a preto) e terceira (tracejado a cinzento) derivada dos espectros de absorvância após subtração dos espectros correspondentes aos brancos, da clonixina (A) e do diclofenac (B), a pH igual a 7,4, na presença de concentrações crescentes de lípido (fosfolípido e colesterol). Concentrações de lípido (1-10) iguais às referidas na legenda da Figura 3.23.

Pela análise da Figura 3.25, pode-se verificar que as diferenças referidas devem-se sobretudo a uma diminuição da intensidade das bandas. Adicionalmente, é possível observar que, como nas derivadas dos espectros dos ensaios anteriores, também nestes é possível verificar a existência de pontos isosbéticos e de um desvio batocrómico dos comprimentos de onda de máxima absorção.

O cálculo dos coeficientes de partição dos fármacos anti-inflamatórios efectuou-se por ajuste da equação 3.6 aos dados experimentais (A_d versus $[L]$), usando um método de regressão não linear. Nas Figuras 3.26 e 3.27 são apresentados exemplos dos ajustes não lineares obtidos na presença de LUVs de EPC com aproximadamente 10 ou 40% de colesterol na sua constituição, respectivamente, pelo programa computacional Origin 6.1[®], para os fármacos clonixina e diclofenac, a um valor de pH igual a 7,4.

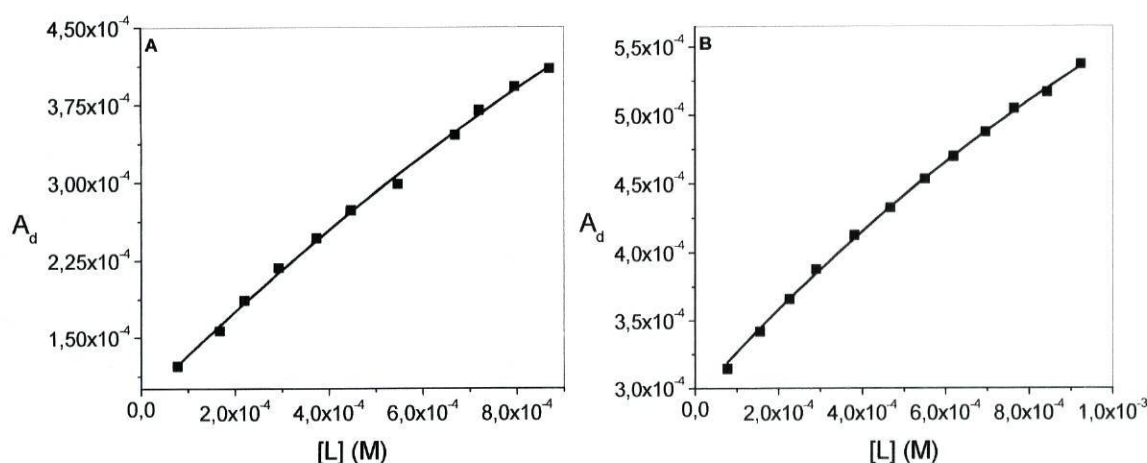


Figura 3.26: Representação gráfica da dependência dos valores da derivada da intensidade de absorvância com a concentração de lipídio (para a clonixina as concentrações de EPC com 10% de colesterol foram iguais a $7,8 \times 10^{-5}$ M; $1,7 \times 10^{-4}$ M; $2,2 \times 10^{-4}$ M; $2,9 \times 10^{-4}$ M; $3,7 \times 10^{-4}$ M; $4,5 \times 10^{-4}$ M; $5,5 \times 10^{-4}$ M; $6,7 \times 10^{-4}$ M; $7,2 \times 10^{-4}$ M; $7,9 \times 10^{-4}$ M; $8,7 \times 10^{-4}$ M, e para o diclofenac as concentrações foram: $7,7 \times 10^{-5}$ M; $1,6 \times 10^{-4}$ M; $2,3 \times 10^{-4}$ M; $3,8 \times 10^{-4}$ M; $4,7 \times 10^{-4}$ M; $5,5 \times 10^{-4}$ M; $6,2 \times 10^{-4}$ M; $7,0 \times 10^{-4}$ M; $7,6 \times 10^{-4}$ M; $8,4 \times 10^{-4}$ M; $9,2 \times 10^{-4}$ M), a pH igual a 7,4. As linhas correspondem ao ajuste não linear, do modelo matemático expresso pela equação 3.6, para a clonixina (λ usado igual a 308 nm da 3ª derivada; A) e diclofenac (λ usado igual a 322 nm da 2ª derivada; B), na presença de lipossomas de EPC com aproximadamente 10% de colesterol.

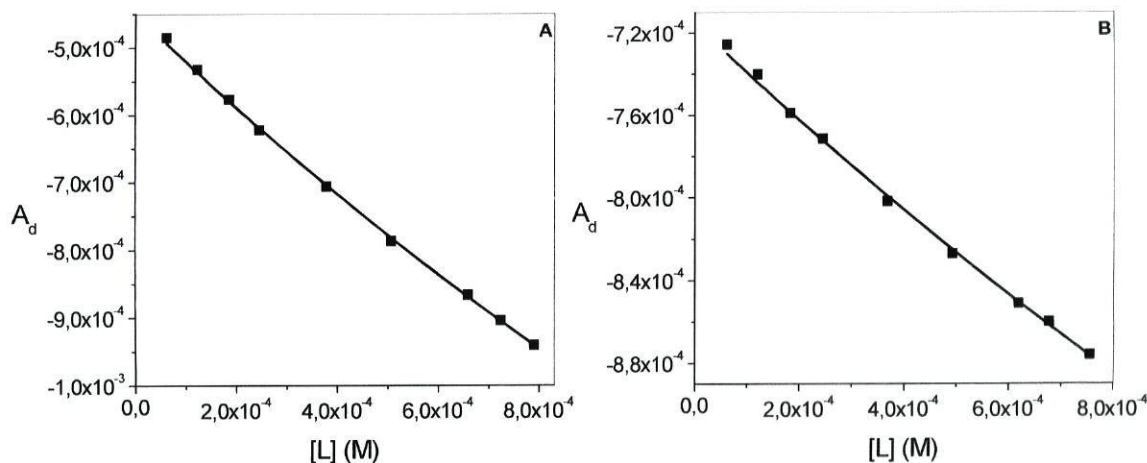


Figura 3.27: Representação gráfica da dependência dos valores da derivada da intensidade de absorvância com a concentração de lipídio (para a clonixina e para o diclofenac as concentrações de EPC + 40% de colesterol são iguais às referidas na legenda da Figura 3.23 (2-10)), a pH igual a 7,4. As linhas correspondem ao ajuste não linear do modelo matemático, expresso pela equação 3.6, para a clonixina (λ usado igual a 297 nm da 2ª derivada; A) e diclofenac (λ usado igual a 287 nm da 2ª derivada; B), na presença de lipossomas de EPC com aproximadamente 40% de colesterol.

O coeficiente de partição foi determinado a partir dos valores de λ onde se observassem maiores diferenças na intensidade de A_d nos espectros de segunda e terceira derivadas. Adicionalmente, utilizaram-se dados relativos a dois ou mais comprimentos de onda diferentes o que permite, por si só, a verificação da eliminação efectiva dos fenómenos de dispersão de luz, bem como a avaliação da reprodutibilidade dos resultados. Assim, os valores de λ dos espectros de segunda e terceira derivadas utilizados no cálculo dos valores de K_p entre os lipossomas com aproximadamente 10 ou 40% de colesterol e a solução aquosa, para a clonixina e para o diclofenac, estão apresentados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3: Valores dos comprimentos de onda, λ , em nm, dos espectros de segunda e terceira derivada para determinação do K_p dos AINEs clonixina e diclofenac, nos ensaios com lipossomas incluindo 10 ou 40% de colesterol.

Fármacos	λ (nm)			
	EPC + 10% colesterol		EPC + 40% colesterol	
	Espectros da segunda derivada	Espectros da terceira derivada	Espectros da segunda derivada	Espectros da terceira derivada
Clonixina	274	295	300	291
	300	308	306	308
	316	320	316	—
Diclofenac	287	271	287	280
	309	281	322	300
	322	317	326	—

Na Tabela 3.4 estão representados os valores dos coeficientes de partição determinados para os AINEs clonixina e diclofenac entre a fase aquosa e a fase lipídica membranar de EPC com aproximadamente 10 e 40% de colesterol. Esses valores de K_p correspondem à média, com o desvio-padrão associado, dos valores de K_p calculados a diferentes valores de comprimento de onda da segunda e da terceira derivadas, obtidos em três ensaios independentes.

Tabela 3.4: Valores de coeficientes de partição lipossoma/tampão adimensionais (K_p), obtidos por espectrofotometria derivativa, para a clonixina e diclofenac, a pH igual a 7,4. Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão dos resultados obtidos em três ensaios independentes.

Fármacos	K_p	
	EPC + 10% colesterol	EPC + 40% colesterol
Diclofenac	870 $\pm$ 90	300 $\pm$ 70
Clonixina	590 $\pm$ 100	270 $\pm$ 40

A análise da Tabela 3.4 revela que o aumento da percentagem de colesterol na bicamada lipídica provocou uma diminuição no valor de K_p , para ambos os fármacos em estudo. Uma conclusão semelhante pode ser obtida se compararmos os dados obtidos neste ensaio com os apresentados no estudo com lipossomas constituídos unicamente por EPC, a um valor de pH igual a 7,4, nomeadamente 1200 $\pm$ 100 para o diclofenac e 660 $\pm$ 100 para a clonixina (Tabela 3.2). Os resultados demonstram que a presença de colesterol nas membranas diminui a partição dos fármacos, o que está de acordo com o facto do colesterol, presente numa membrana fluida, diminuir consideravelmente a permeabilidade da bicamada lipídica, além de aumentar a sua estabilidade e reduzir a mobilidade das suas moléculas [18].

3.4.2.2 Determinação do coeficiente de partição por avaliação do potencial-zeta

Os anti-inflamatórios clonixina e diclofenac encontram-se predominantemente carregados negativamente a um valor de pH igual a 7,4, e, deste modo, a sua partição nos lipossomas levou à formação de um potencial mais negativo na superfície membranar. Com efeito, os resultados obtidos de potencial-zeta (ζ), na presença de concentrações crescentes de clonixina e diclofenac, em tampão hepes (pH igual a 7,4), mostraram uma diminuição de $\zeta = -1,0$ mV, para lipossomas de EPC na ausência de fármaco a $\zeta = -13,6$ mV e $\zeta = -17,5$ mV para 500 μ M de clonixina e diclofenac, respectivamente. A diminuição do valor de potencial-zeta é, como referido anteriormente, uma consequência directa da interacção do fármaco na forma negativa com a membrana, visto que o diclofenac e a clonixina encontram-se praticamente

todos ionizados a um valor de pH igual a 7,4 (numa percentagem igual a 98,7% e 99,9%, para a clonixina e diclofenac, respectivamente).

Os valores de ζ obtidos experimentalmente, para diferentes concentrações de AINEs, foram utilizados para calcular os valores do potencial de superfície (Ψ_0), a partir das equações 3.11 a 3.15, nas quais o valor de 0,96 nm foi usado para $1/\kappa$, valor este que foi calculado para um meio com 0,1 M (NaCl) de força iónica [21, 63]. Na Figura 3.28 está representada a dependência dos valores de ζ e de Ψ_0 com a concentração de clonixina e diclofenac na presença de LUVs a um valor de pH igual a 7,4.

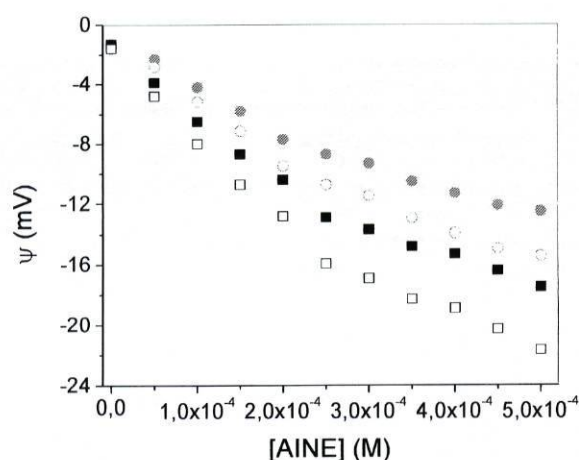


Figura 3.28: Variação dos valores de potencial-zeta (símbolos cheios) e do potencial de superfície (símbolos ociosos) com a concentração de clonixina (círculos) e diclofenac (quadrados), a pH igual a 7,4, na presença de 400 μ M de lipossomas unilamelares de EPC.

Como é possível observar na Figura 3.28, os valores de Ψ_0 são ligeiramente inferiores aos de ζ , uma vez que a distância da membrana atenua os efeitos electrostáticos.

O valor de potencial-zeta, como referido no capítulo 2, pode ser calculado a partir da medida da mobilidade electroforética e corresponde ao potencial a 2 Å da superfície, de acordo com o referido por Eisenberg *et al* [22]. Contudo, uma vez conhecido o valor de ζ , é possível o cálculo do potencial de superfície, como já referido anteriormente.

Após o cálculo dos valores de Ψ_0 , foi possível determinar a densidade de carga superficial, σ , a partir da equação 3.16, devido à presença de A^- (moléculas dos AINEs

clonixina e diclofenac com carga negativa) na superfície dos lipossomas, pois os valores de potencial-zeta apenas dependem do número de moléculas de fármaco carregadas negativamente na superfície membranar. E, conseqüentemente, o cálculo do número de moléculas ligadas por área de superfície (σ_A^* ; equação 3.17). Os valores de $\sigma_{\max}^*$ foram determinados por um ajuste de regressão não linear da equação 3.19, numa representação gráfica σ^* versus a concentração total de fármaco adicionado ao sistema, $[A^T]$. Na Figura 3.29, é possível visualizar um exemplo obtido para esta determinação, na presença de diferentes concentrações de clonixina e diclofenac.

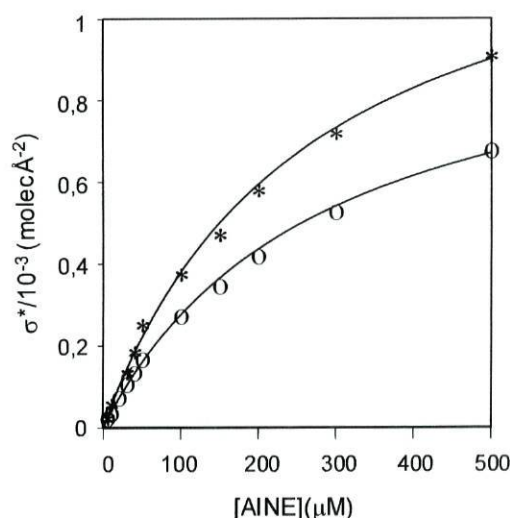


Figura 3.29: Dependência do número de moléculas carregadas por unidade de área (σ^*) com a concentração de clonixina (○) e diclofenac (*) a pH igual a 7,4, na presença de 400 μM de EPC. A curva representa o melhor ajuste da equação 3.19 aos dados experimentais.

O valor de $\sigma_{\max}^* = \sigma_{\max}^{A^-}$ obtido foi de $1,20 \pm 0,20 \times 10^{-3}$ moléculas/Å² e de $1,52 \pm 0,14 \times 10^{-3}$ moléculas/Å² (média e desvio padrão de três experiências independentes), para a clonixina e diclofenac, respectivamente. De facto, como a um valor de pH igual a 7,4, os AINEs em estudo existem predominantemente na forma ionizada, a igualdade $\sigma_{\max}^* = \sigma_{\max}^{A^-}$ é válida [21]. Assim, a este valor de pH pode considerar-se que existe apenas uma espécie, a forma carregada da molécula, a interagir com a membrana, e deste modo $K_p^T = K_p^{A^-}$.

Com o valor de $\sigma_{\max}^*$ é possível efectuar o cálculo do K_p^* pela equação 3.7 ou 3.9, se a concentração de fármaco na interface for conhecida. O valor deste parâmetro pode ser calculado a partir da concentração de fármaco na solução aquosa e do potencial de superfície segundo a expressão 3.21. A $[A_a^-]$ foi calculada com base no balanço de massas $[A_a^-] = [A^T] - [A_m^-]$, tendo sido a concentração de fármaco carregado negativamente na membrana determinada pela equação 3.25. Desta forma, como já referido, o coeficiente de partição obtido refere-se apenas à forma negativa do fármaco, mas como a um valor de pH igual a 7,4 os AINEs se encontram dissociados numa elevada extensão, o K_p da forma negativa é muito semelhante ao coeficiente de partição total.

No entanto, para relacionar os coeficientes de partição obtidos nesta metodologia com os determinados pelas outras técnicas (espectrofotometria derivativa e desactivação de fluorescência), torna-se necessário o cálculo do valor de K_p pela equação 3.10.

O cálculo de $\bar{n}$ pela equação 3.20 (como a determinação da concentração de fármaco na membrana pela equação 3.25) necessita do conhecimento da superfície molecular para uma molécula de fosfatidilcolina na membrana e para uma molécula de fármaco, a_L e a_A , respectivamente. O valor de a_L está descrito na literatura como $60 \text{ \AA}^2$ [65], mas a área de superfície molecular da clonixina e do dilofenac, a_A , não foi determinada e foi-lhe atribuído o mesmo valor de $60 \text{ \AA}^2$, uma vez que este parâmetro não afecta significativamente os resultados obtidos (como também observado no cálculo de $[A_m^-]$) [21]: por exemplo para o diclofenac $\bar{n} = 10,1 \pm 1,0$ com $a_A = 60 \text{ \AA}^2$ e $\bar{n} = 10,8 \pm 1,0$ com $a_A = 20 \text{ \AA}^2$ e, conseqüentemente, o valor obtido para o K_p do diclofenac foi 1069 ± 322 com $a_A = 60 \text{ \AA}^2$ e 1063 ± 325 com $a_A = 20 \text{ \AA}^2$.

O valor calculado de $\bar{n}$ foi igual a $14,5 \pm 2,0$ para a clonixina e, como referido anteriormente, igual a $10,1 \pm 1,0$ para o diclofenac.

Os resultados obtidos apresentaram uma diminuição nos valores de K_p com o aumento da concentração de fármaco (de 580 para 20 μM a 240 para 500 μM para a clonixina e de 1070 para 20 μM a 405 para 500 μM para o diclofenac), indicando que a influência dos efeitos electrostáticos nos valores do coeficiente de partição não podem ser negligenciados para concentrações de fármaco elevadas. O valor apresentado na Tabela 3.5 corresponde à média dos valores de K_p adimensionais (divisão do valor de K_p expresso em M^{-1} por V_ϕ) obtidos para concentrações de clonixina e diclofenac

inferiores a 50 μM , os quais estão na ordem de magnitude das concentrações de fármaco usadas nas outras duas técnicas utilizadas neste estudo para a determinação deste parâmetro.

Tabela 3.5: Valores de coeficientes de partição adimensionais (K_p), obtidos por potencial-zeta, a pH igual a 7,4, para a clonixina e diclofenac. Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão dos resultados obtidos em três ensaios independentes.

Fármacos	K_p
Diclofenac	1070 ± 320
Clonixina	580 ± 120

Atendendo à definição de coeficiente de partição e, uma vez que são conhecidos os valores das concentrações de fármaco na solução aquosa imediatamente adjacente à membrana e no interior desta, o K_p adimensional também poderia ser determinado pela seguinte fórmula (idêntica à equação 3.4 apresentada na metodologia referente à espectrofotometria derivativa):

$$K_p^{A^-} = \frac{[A_m^-] / V_m}{[A_a^-] / V_a} \approx \frac{[A_m^-]}{[A_a^-][L]V_\phi} \quad (3.41)$$

De facto, os valores de K_p obtidos com as equações 3.10 ou 3.41, para a $[A_i^-]$ (em vez de $[A_a^-]$ na fórmula 3.41) foram muito semelhantes para todas as concentrações de fármaco adicionadas ao sistema (Tabela 3.6).

O coeficiente de partição adimensional foi também calculado através da concentração de fármaco na solução aquosa e não na interface pela equação 3.41. Os resultados, de um ensaio presente na Tabela 3.6, mostram que os valores obtidos com a concentração na fase aquosa são menores que os calculados tendo em conta a concentração na interface e essa diferença é maior quando a concentração de fármaco aumenta. Contudo, para uma concentração de fármaco menor que 50 μM os dois conjuntos de resultados são similares, sugerindo que a influência dos efeitos

electrostáticos no coeficiente de partição pode ser negligenciada para baixas concentrações de fármaco. Sob estas condições, pode-se considerar que $[A_i^-] \cong [A_a^-]$ e, assim, é indiferente a utilização da concentração na interface ou no seio da solução aquosa para o cálculo do coeficiente de partição. No entanto, para elevadas concentrações de fármaco (no presente caso, superiores a 50 μM), a partição de A^- nos lipossomas cria um aumento na densidade de carga à superfície dos lipossomas e as repulsões electrostáticas com as espécies carregadas negativamente presentes em solução não podem mais ser negligenciadas e, deste modo, a concentração de A^- na superfície membranar é menor que no seio da solução, $[A_i^-] < [A_a^-]$. De facto, o valor de K_p obtido a partir da equação 3.41 foi de 131 e de 183 para 500 μM de clonixina e diclofenac, respectivamente, consideravelmente menores dos que obtidos (240 e 405 para uma concentração igual a 500 μM de clonixina e diclofenac, respectivamente) quando se tem em conta apenas a concentração interfacial, como se pode observar na Tabela 3.6.

Tabela 3.6: Valores de coeficientes de partição adimensionais (K_p), calculados a partir da concentração de fármaco na interface ($K_p(A_i)$) ou na solução aquosa ($K_p(A_a)$), pelas equações 3.10 e/ou 3.41, na presença de diferentes concentrações de clonixina e diclofenac, a pH igual a 7,4.

[AINE] (μM)	Clonixina			Diclofenac		
	$K_p(A_i)$	$K_p(A_i)$	$K_p(A_a)$	$K_p(A_i)$	$K_p(A_i)$	$K_p(A_a)$
	Equação 3.10	Equação 3.41	Equação 3.41	Equação 3.10	Equação 3.41	Equação 3.41
5	1390	1388	1323	1390	1391	1326
10	735	734	693	1070	1070	991
20	579	579	528	723	723	684
30	514	514	456	647	647	561
40	469	468	406	664	665	551
50	461	461	388	746	746	585
100	378	379	291	574	574	405
150	328	329	237	507	507	329
200	311	312	212	506	507	300
300	279	280	174	463	463	244
500	239	240	131	405	405	183

O referido mostra que para baixas concentrações de fármaco a igualdade $[A_i^-] = [A_a^-]$ pode ser usada e, deste modo, os coeficientes de partição determinados por metodologias que têm por base a concentração de fármaco na fase aquosa, proporcionam uma descrição fidedigna da partição verificada nas membranas. No entanto, o mesmo não se verifica para elevadas concentrações de fármaco, uma vez que nestas condições, tal igualdade não se verifica. De facto, os coeficientes de partição obtidos através dos valores das concentrações de fármaco na solução aquosa são menores do que aqueles que efectivamente consideram a concentração na superfície da membrana, visto que a partição é apenas estabelecida pela concentração na interface e $[A_i^-] < [A_a^-]$.

3.4.2.3. Determinação do coeficiente de partição por desactivação de fluorescência

A aplicação da equação 3.28 à diminuição da intensidade de fluorescência medida experimentalmente em função da concentração total do AINE em estudo permitiu a determinação do valor da constante aparente de Stern-Volmer. Com efeito, a representação gráfica de $I_0/I - 1$ em função de $[Q]_T$, para cada concentração de lípido, originou uma recta com ordenada na origem igual a zero e declive igual a K_{SV}^{app} .

A partir dos valores de K_{SV}^{app} obtidos para os diferentes V_m , foi possível a determinação do coeficiente de partição, por um método de regressão não linear, através da equação 3.29 (Figura 3.30).

Pela observação da Figura 3.30, verifica-se, de facto, que há uma diminuição do valor de K_{SV}^{app} com o aumento do volume de lípido. Os valores dos parâmetros K_p adimensional (divisão do valor de K_p expresso em M^{-1} por V_ϕ) e K_{SV} obtidos estão incluídos na Tabela 3.7.

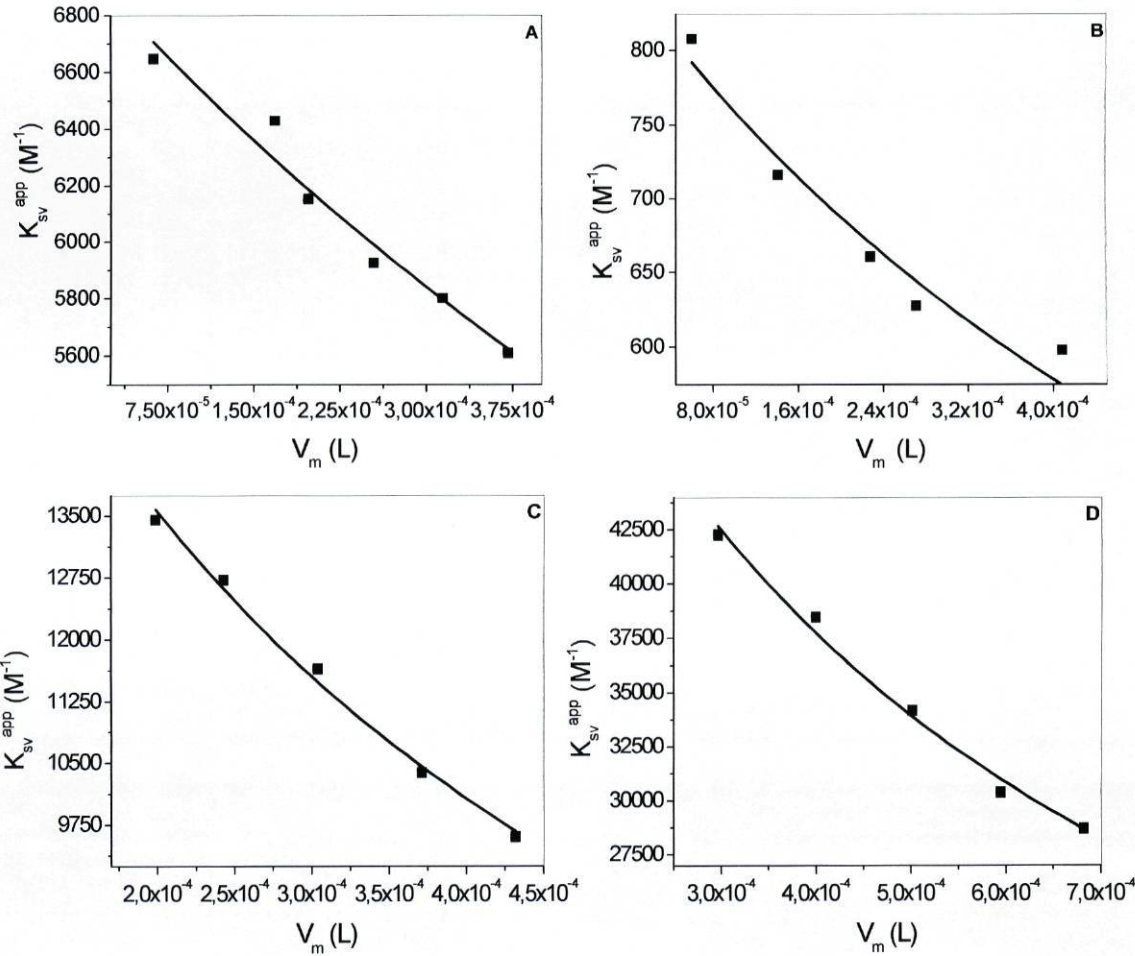


Figura 3.30: Representação gráfica da dependência dos valores de K_{sv}^{app} com o volume de lípido. As linhas correspondem ao ajuste não linear do modelo matemático, expresso pela equação 3.29, para a clonixina (A), diclofenac (B), piroxicam (C) e tenoxicam (D).

Tabela 3.7: Valores de K_{sv} (M^{-1}) e de K_p (adimensionais), obtidos para a clonixina, diclofenac, piroxicam e tenoxicam, em lipossomas unilamelares de EPC, a pH igual a 7,4. Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão dos resultados obtidos em três ensaios independentes.

Fármacos	K_p	K_{sv} (M^{-1})
Diclofenac	1170 ± 200	$0,73 \pm 0,09$
Clonixina	670 ± 130	$10,77 \pm 1,03$
Piroxicam	2680 ± 190	$7,83 \pm 0,37$
Tenoxicam	2320 ± 90	$30,78 \pm 0,67$

A comparação dos valores de K_p obtidos pela técnica de desactivação de fluorescência (Tabela 3.7) com os valores já obtidos por espectrofotometria derivativa e potencial-zeta (Tabelas 3.2 e 3.5), permitiu verificar que os resultados fornecidos pelas três técnicas referidas são concordantes.

3.4.3. Determinação da localização dos AINEs

A localização dos AINEs na bicamada lipídica foi avaliada pela comparação da eficácia de desactivação da fluorescência de sondas da série *n*-AS ($n = 2, 6, 9$ e 12), as quais possibilitaram ainda o conhecimento de quão profundamente determinado fármaco se situa na membrana, uma vez que contêm o mesmo grupo fluorescente ligado a diferentes posições da cadeia hidrocarbonada.

Os anti-inflamatórios em estudo, com excepção do indoprofeno e do etodolac em concentrações aproximadamente inferiores ou iguais a $120 \mu\text{M}$, causaram desactivação de fluorescência de todas as sondas *n*-AS utilizadas. Na Figura 3.31 A, é possível observar um exemplo da desactivação de fluorescência da sonda 12-AS, perante concentrações crescentes de clonixina e a constância dos valores de intensidade de fluorescência obtidos para o indoprofeno, na presença da mesma sonda mencionada, enquanto que na Figura 3.31 B apresenta-se a eficácia de desactivação de fluorescência do etodolac face às diversas sondas *n*-AS.

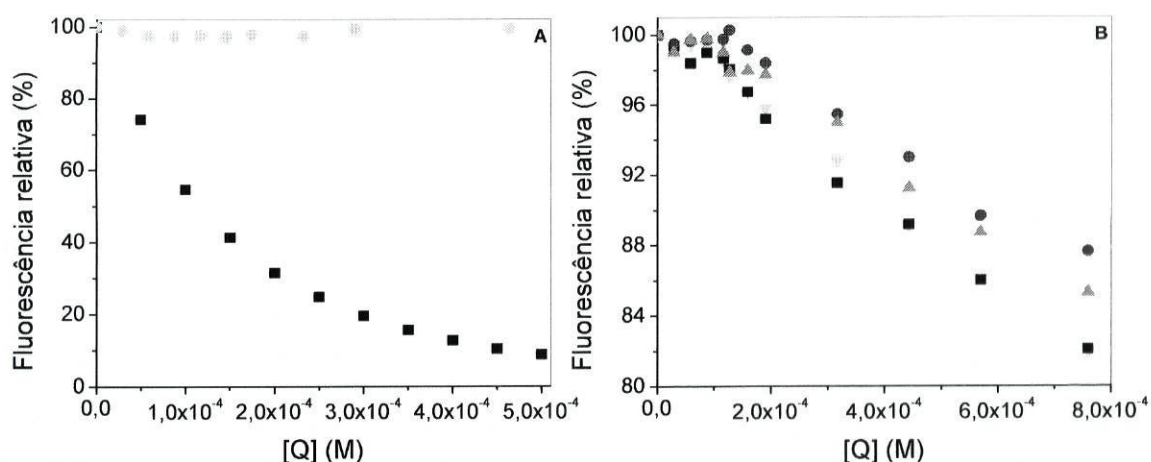


Figura 3.31 A: Fluorescência relativa, em percentagem, da sonda 12-AS em LUVs (500 μM), a pH 7,4, na presença de concentrações crescentes de clonixina (■) e indoprofeno (●). B: Fluorescência relativa, em percentagem, das sondas *n*-AS (2-AS: ■; 6-AS: ●; 9-AS: ▲; 12-AS: ▼) incorporadas em LUVs (500 μM), a pH igual a 7,4, na presença de concentrações crescentes de etodolac.

A diminuição da intensidade de fluorescência, quer do espectro de excitação, quer do espectro de emissão das sondas *n*-AS, na presença de concentrações crescentes de desactivador (fármaco) ocorreu sem alteração significativa das bandas espectrais, o que significa que o fenómeno de desactivação será provavelmente do tipo colisional [78]. Na Figura 3.32 estão representados os espectros de excitação e de emissão da sonda 2-AS na presença dos AINEs piroxicam e tenoxicam. O mesmo padrão pode ser observado para todas as sondas da série *n*-AS, com os diferentes fármacos.

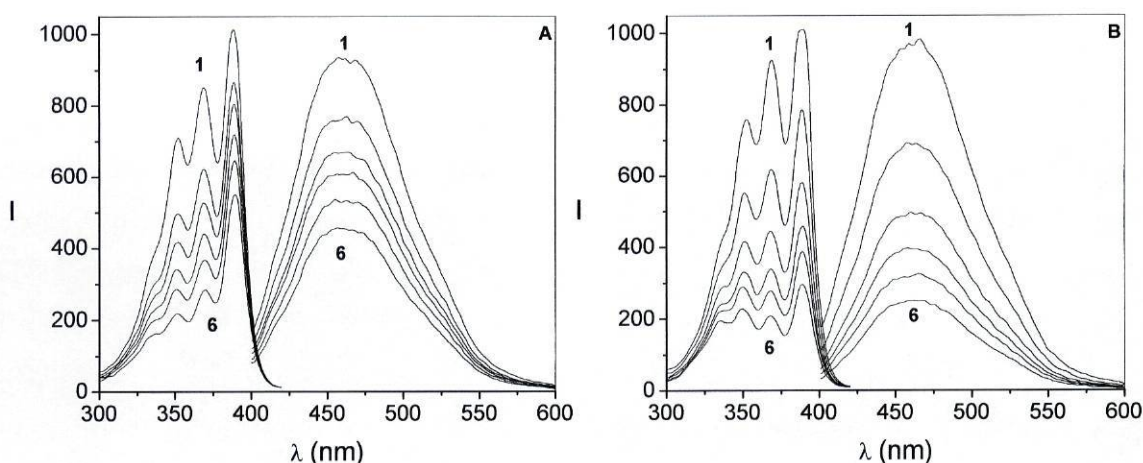


Figura 3.32: Espectros de excitação e de emissão da sonda 2-AS incorporada em lipossomas unilamelares (500 μ M), na presença de concentrações crescentes (0 – 52 μ M) de piroxicam (A) e de tenoxicam (B), a pH igual a 7,4. A denotação numérica de 1 a 6 assinala os espectros obtidos na presença de concentrações crescentes de fármaco: 0, 13, 22, 30, 39 e 52 μ M.

Considerando que o processo de desactivação de fluorescência é colisional, a diminuição de fluorescência relaciona-se com a concentração de desactivador pela equação 3.28, a qual, representada graficamente, origina uma função linear de $I_0/I-1$ versus $[Q]_T$ (Figura 3.33). Os declives das rectas de Stern-Volmer obtidos correspondem a valores da constante aparente de Stern-Volmer, K_{SV}^{app} . A Tabela 3.8 contem os valores de K_{SV}^{app} obtidos para os AINEs em estudo, bem como os valores de K_q , calculados pela equação 3.31, para os AINEs clonixina, diclofenac, tenoxicam e piroxicam e os valores de K_q^{app} determinados a partir da equação 3.32 para o etodolac. A inexistência de valores de K_q para o etodolac é devida ao facto da interacção deste AINE com os lipossomas de EPC não ser significativa nas condições

experimentais utilizadas para a determinação do valor de K_p , o qual é necessário para o cálculo do valor de K_{sv} (pela equação 3.29). Deste modo, utilizou-se os valores de K_{sv}^{app} obtendo-se, consequentemente, valores de K_q^{app} , os quais também têm sido usados para inferir acerca da localização de fármacos por vários autores [15].

Os valores de K_q e de K_q^{app} constituem uma ferramenta útil na inferência da localização relativa de um soluto na membrana [67, 68], uma vez que reflectem, ao contrário dos valores de K_{sv}^{app} , a eficácia de desactivação de fluorescência de cada uma das sondas pela presença do fármaco desactivador, de uma forma independente das diferenças intrínsecas do microambiente observado para cada sonda, que se repercutem nos valores de τ_0 .

Pela observação da Tabela 3.8, pode-se verificar, como já referido anteriormente, que todas as sondas *n*-AS incorporadas em LUVs, a um valor de pH igual a 7,4, sofreram desactivação de fluorescência pelos fármacos em estudo, excepto pelo indoprofeno, o que leva a pensar que existem vários grupos funcionais ao longo da molécula que podem ser responsabilizados pela diminuição da fluorescência destas sondas, nomeadamente os grupos carboxílicos, devido à electronegatividade do oxigénio, o grupo indol (estudos demonstraram que o grupo indol do triptofano é capaz de desactivar a fluorescência de moléculas contendo o fluoróforo antroiloxi em vesículas de DMPC a 20°C [71]), o grupo carbonilo e o cloro (os halogéneos, principalmente o bromo, são usados como desactivadores de fluorescência ligados covalentemente a ácidos gordos [23]). Ainda, pela análise da Tabela 3.8, pode-se verificar que a eficiência relativa de desactivação de fluorescência pelo diclofenac seguiu a ordem: 2-AS $\approx$ 12-AS > 9-AS $\approx$ 6-AS, enquanto que para a clonixina e oxicamos a ordem observada foi: 2-AS > 6-AS > 9-AS > 12-AS, e que, finalmente, para o etodolac a ordem observada foi a seguinte: 2-AS > 12-AS > 6-AS $\approx$ 9-AS.

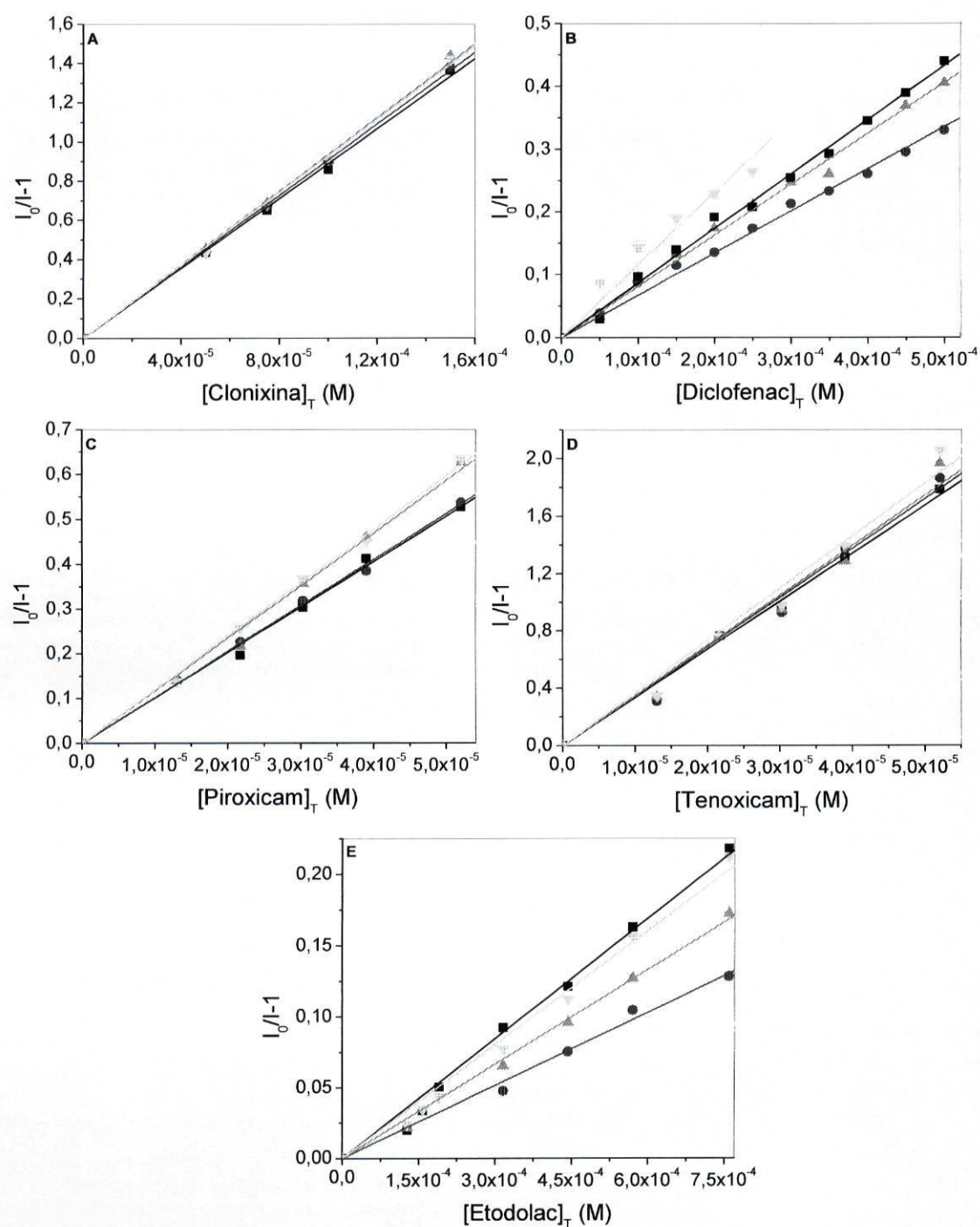


Figura 3.33: Representação gráfica da equação de Stern-Volmer para a desativação de fluorescência da série de sondas *n*-AS (2-AS: ■, 6-AS: ●, 9-AS: ▲, 12-AS: ▼) pela clonixina (A), diclofenac (B), piroxicam (C), tenoxicam (D) e etodolac (E), em LUVs de EPC (aproximadamente 500 μ M), a pH igual a 7,4 e a 25°C.

Tabela 3.8: Valores da constante aparente de Stern-Volmer, K_{SV}^{app} e da constante bimolecular de desactivação de fluorescência, K_q , obtidos para a clonixina, diclofenac, tenoxicam, piroxicam, etodolac e indoprofeno em lipossomas unilamelares de EPC (500 μ M, pH = 7,4) marcados com as sondas *n*-AS. Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão dos resultados obtidos em três ensaios independentes.

AINEs	K_{SV}^{app}				$K_q \times 10^8 \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$			
	2-AS	6-AS	9-AS	12-AS	2-AS	6-AS	9-AS	12-AS
Clonixina	8080 $\pm$ 300	7970 $\pm$ 300	8300 $\pm$ 200	8060 $\pm$ 300	25,9 $\pm$ 0,77	23,5 $\pm$ 0,56	21,1 $\pm$ 0,13	15,6 $\pm$ 0,12
Diclofenac	700 $\pm$ 20	500 $\pm$ 70	610 $\pm$ 70	1110 $\pm$ 20	1,42 $\pm$ 0,25	0,93 $\pm$ 0,08	0,98 $\pm$ 0,06	1,36 $\pm$ 0,15
Tenoxicam	30829 $\pm$ 646	31403 $\pm$ 595	31463 $\pm$ 993	33426 $\pm$ 797	48 $\pm$ 1,8	44 $\pm$ 0,1	36 $\pm$ 0,7	30 $\pm$ 0,9
Piroxicam	10504 $\pm$ 1258	10601 $\pm$ 1055	11327 $\pm$ 232	11759 $\pm$ 506	15 $\pm$ 1,5	14 $\pm$ 1,5	13 $\pm$ 0,2	10 $\pm$ 0,6
Etodolac	251 $\pm$ 20	176 $\pm$ 4	200 $\pm$ 16	300 $\pm$ 24	4,33 $\pm$ 0,48*	2,79 $\pm$ 0,14*	2,74 $\pm$ 0,22*	3,12 $\pm$ 0,35*
Indoprofeno	_____**	_____**	_____**	_____**	_____**	_____**	_____**	_____**

* $K_q^{app} \times 10^2 \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$

**não foi possível determinar um valor nas condições experimentais estabelecidas

Os resultados obtidos para o diclofenac sugerem que este fármaco pode estar localizado perto dos grupos polares dos fosfolípidos, provavelmente através de interacções electrostáticas com o grupo amina da colina carregado positivamente, uma vez que este AINE se encontra praticamente todo na forma negativa (99,9%), a um valor de pH igual a 7,4. Por outro lado, a estrutura química do diclofenac pode fornecer uma explicação para a elevada eficiência de desactivação de fluorescência observada para a sonda 12-AS, através da presença de um grupo adicional desactivador de fluorescência (átomo de cloro) possivelmente localizado na proximidade da posição do carbono 12 da cadeia acil dos fosfolípidos. Quanto à clonixina, os resultados obtidos sugerem que este anti-inflamatório não se encontre profundamente localizado no interior da bicamada lipídica, mas preferencialmente perto da superfície polar membranar. Assim, a localização proposta para a clonixina é corroborada pela observação da sua estrutura química, onde é possível observar a presença do grupo carboxílico desprotonado (98,7%), a um valor de pH igual a 7,4, que pode explicar a maior eficácia de desactivação para as sondas localizadas na proximidade da superfície polar da bicamada lipídica. Adicionalmente, a presença de um grupo desactivador (átomo de cloro), provavelmente localizado mais profundamente na

bicamada, pode explicar a desactivação de fluorescência observada para as sondas aí localizadas. Relativamente aos oxicamos estudados, o pequeno decréscimo observado em direcção à zona mais interna da bicamada, sugere que estes fármacos estejam localizados, provavelmente, com os seus grupos hidrofílicos orientados para a zona polar da membrana, enquanto que os seus grupos hidrofóbicos estarão localizados junto às cadeias lipofílicas dos ácidos gordos da membrana. Esta localização proposta corrobora outros estudos de localização efectuados por modulação molecular para oxicamos [96]. Finalmente, para o etodolac, é possível verificar que os valores de K_{SV}^{app} obtidos para todas as sondas *n*-AS são significativamente menores que os obtidos para os outros fármacos estudados, com excepção do indoprofeno (Tabela 3.8), o que significa que o etodolac interage com todas as sondas *n*-AS usadas, mas numa menor extensão. A menor eficácia de desactivação de fluorescência verificada para o etodolac pode estar relacionada com o menor número de moléculas presentes no interior da bicamada lipídica, comparativamente às existentes dos outros AINEs, com excepção do indoprofeno. Esta observação é corroborada pela constância dos valores de intensidade de fluorescência para concentrações de etodolac inferiores ou iguais a 120 μ M e por não ter sido possível quantificar a interacção deste AINE com os lipossomas nos estudos efectuados por espectrofotometria derivativa de UV/Vis. Com efeito, estes dois factos sugerem que a partilha do etodolac entre a fase aquosa e lipídica deve ser efectuada em pequena extensão. A ordem de eficiência de desactivação de fluorescência relativa obtida sugere que este AINE se encontre preferencialmente localizado, pelo seu grupo carboxílico desprotonado, carregado negativamente, junto à zona polar da membrana dipolar, como o referido para a clonixina e diclofenac. O resto da molécula, mais apolar, deve interdigitar-se por entre as caudas dos fosfolípidos, possivelmente alinhando os seus átomos de forma a diminuir o volume ocupado lateralmente, e possivelmente com o grupo indol mais próximo da sonda 12-AS, o que justifica a maior eficiência de desactivação de fluorescência observada para a sonda referida, em detrimento da eficiência de desactivação de fluorescência verificada para as sondas 6-AS e 9-AS.

3.4.4. Avaliação dos efeitos dos AINEs a nível membranar

3.4.4.1. Determinação do diâmetro e potencial-zeta da membrana

Diâmetro dos lipossomas: A população de LUVs, na ausência e na presença de concentrações crescentes de AINEs, mostrou-se uma população homogénea com tamanho bem definido. De facto, a interacção dos diversos anti-inflamatórios com os lipossomas de EPC, aos dois valores de pH distintos (7,4 e 3,0), não provocou uma variação no tamanho médio das vesículas e o índice de polidispersão obtido foi sempre menor do que 0,1. Na Tabela 3.9 apresenta-se, como exemplo, os resultados, de um ensaio, obtidos para o tamanho médio dos LUVs na presença de diferentes concentrações de diclofenac, a um valor de pH igual a 7,4.

Tabela 3.9: Tamanho médio de LUVs de EPC (400 μM) na presença de concentrações crescentes de diclofenac, a pH igual a 7,4.

[Diclofenac] (μM)	Tamanho médio (nm)
0	133,0
50	131,8
100	132,5
150	132,5
200	132,9
250	134,8
300	133,7
350	133,1
400	133,0
450	132,0
500	133,1

Potencial-zeta dos lipossomas: O potencial-zeta (ζ), medido nas mesmas suspensões utilizadas na determinação do diâmetro dos LUVs, apresentou uma variação de potencial de membrana das vesículas para alguns dos fármacos testados. De facto, a um valor de pH igual a 7,4, a interacção dos AINEs diclofenac, clonixina e etodolac, preferencialmente carregados negativamente, com a membrana lipídica electricamente neutra, conferiu um potencial de superfície mais negativo à membrana.

Pelo contrário, a interacção do tenoxicam, piroxicam e indoprofeno com a membrana não provocou uma alteração significativa do seu potencial de superfície. Na Figura 3.34 é possível observar a variação dos valores de potencial-zeta obtidos com o aumento da concentração dos AINEs.

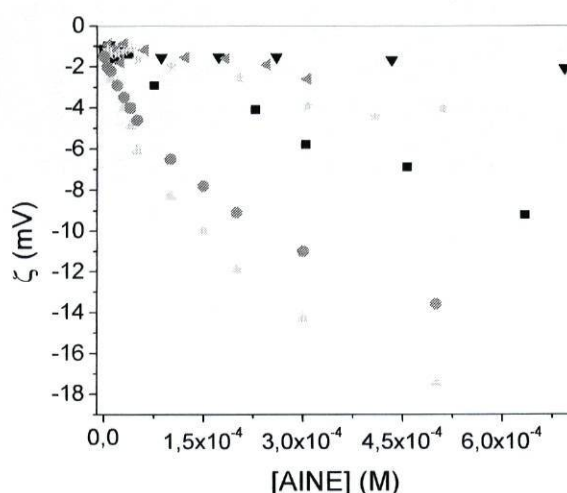


Figura 3.34: Variação do valor de potencial-zeta (ζ) com a concentração dos AINEs diclofenac (▲), clonixina (●), etodolac (■), tenoxicam (★), piroxicam (◄) e indoprofeno (▼), na presença de 400 μ M de LUVs de EPC, a pH igual a 7,4.

A Figura 3.34 mostra que, embora a fosfatidilcolina seja uma molécula dipolar, o potencial medido para as vesículas de EPC foi negativo, mas muito próximo de zero, como referido no capítulo 2. Este facto pode ser devido à adsorção preferencial de aniões da solução aquosa. Adicionalmente, pode-se observar, pela Figura 3.34, que os valores de potencial-zeta dos lipossomas de EPC, a um valor de pH igual a 7,4, decresceram à medida que a concentração total de diclofenac, clonixina e etodolac aumentava, enquanto que para os fármacos indoprofeno, piroxicam e tenoxicam não se verificou praticamente variação desses valores. Os resultados obtidos estão de acordo com a forma carregada ou dipolar dos fármacos apresentada maioritariamente ao valor de pH em estudo e, adicionalmente, com a possível localização dessas mesmas moléculas na bicamada lipídica. Assim, as moléculas de diclofenac (pK_a igual a 3,97), clonixina (pK_{a1} e pK_{a2} iguais a 5,53 e 2,20, respectivamente) e etodolac (pK_a igual a 4,65 [97]) apresentam-se preferencialmente carregados negativamente a um valor de pH igual a 7,4, e, possivelmente, com estes grupos polares, responsáveis pela carga, localizados superficialmente perto dos grupos polares dos fosfolípidos, o

que justifica a obtenção dos resultados apontados. A descida dos valores de potencial-zeta para o AINE etodolac em concentrações inferiores às anteriormente referidas para se verificar uma partição significativa (aproximadamente iguais ou superiores a $120\text{ }\mu\text{M}$) pode ser justificada pela existência de fenómenos electrostáticos. De facto, frequentemente, os fenómenos de partição simples são complementados por fenómenos electrostáticos.

Não houve, no entanto, uma diminuição significativa dos valores de ζ para o tenoxicam e piroxicam (diferenças menores que 3 mV [98]) no intervalo de concentrações usado, o que está de acordo com a presença preferencial destes fármacos na forma dipolar, a um valor de pH igual a 7,4, no meio reaccional. Finalmente, os valores de potencial-zeta obtidos na presença de concentrações crescentes do anti-inflamatório indoprofeno foram muito constantes para todas as concentrações ensaiadas. Este estudo, mais uma vez, mostra que não foi possível observar uma interacção entre o AINE referido e os LUVs de EPC, a um valor de pH igual a 7,4.

Ao contrário do que se verificou a um valor de pH igual a 7,4, a um valor de pH igual a 3,0, os AINEs clonixina e diclofenac não apresentaram capacidade para alterar o valor do potencial da membrana (Figura 3.35).

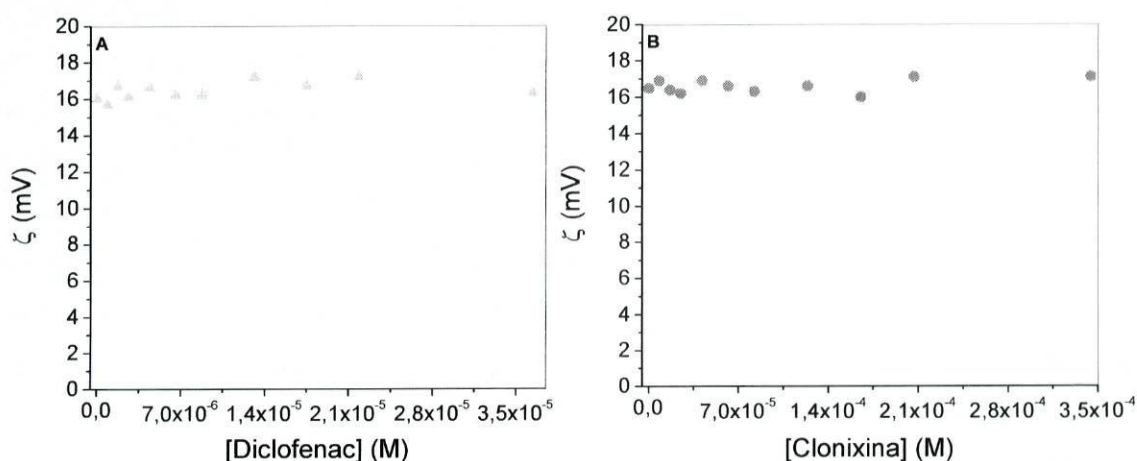


Figura 3.35: Variação do valor de potencial-zeta (ζ) com a concentração dos AINEs diclofenac (A) clonixina (B), na presença de $400\text{ }\mu\text{M}$ de LUVs de EPC, a pH igual a 3,0.

Como é possível observar na Figura 3.35, o potencial positivo apresentado pelas vesículas de EPC a este valor de pH, devido à protonação do seu grupo fosfato, não sofreu alteração na presença de diferentes concentrações de diclofenac e

clonixina. De facto, a um valor de pH igual a 3,0, o diclofenac encontra-se predominantemente na sua forma neutra em solução aquosa e, por este motivo, não origina uma alteração no potencial de superfície da membrana. Relativamente à clonixina, ao valor de pH referido, este fármaco encontra-se, em solução aquosa, preferencialmente na forma positiva e dipolar em detrimento da forma negativa, numa proporção semelhante à observada para as espécies do ácido niflúmico, que possui, como anteriormente referido, valores de pK_{a1} e pK_{a2} semelhantes aos obtidos para a clonixina [51]. Assim, deve ocorrer repulsão electrostática entre as moléculas de clonixina carregadas positivamente e a superfície membranar também com carga positiva, e, conseqüentemente, a partição deve ser efectuada preferencialmente pelas moléculas de clonixina na forma dipolar. Deste modo, não se verifica uma alteração do potencial-zeta dos lipossomas de EPC.

3.4.4.2. Determinação da fluidez membranar

Os efeitos dos AINEs clonixina, diclofenac, piroxicam, tenoxicam, etodolac e indoprofeno na microviscosidade interna das membranas foram avaliados por estudos de anisotropia de fluorescência de estado estacionário, os quais têm sido largamente usados para estudar a influência de vários fármacos no "gradiente de fluidez" em modelos membranares, pelas sondas *n*-AS [72]. Contudo, nestes estudos, como referido anteriormente, não é possível uma correlação directa entre os dados experimentais e a fluidez membranar. Assim, foi necessário considerar as correcções apropriadas aos valores de anisotropia medidos experimentalmente, descritas em 3.2.4.2, para validar essa relação.

Nas Figuras 3.36 e 3.37 é possível observar alguns exemplos de comparação entre r_{ss} e r' e a respectiva diferença obtida na presença de concentrações membranares crescentes de fármaco. Assim, a Figura 3.36 apresenta o diclofenac, que é um fármaco capaz de diminuir a fluidez membranar e, pelo contrário, na Figura 3.37, A e B representam exemplos de fármacos capazes de a aumentar, nomeadamente os AINEs clonixina e tenoxicam.

Os resultados obtidos permitiram a análise diferencial da capacidade dos AINEs em perturbarem a membrana como um todo, e, adicionalmente, também possibilitaram a comparação da perturbação observada para cada sonda. De facto, como cada uma das sondas *n*-AS utilizadas está localizada a diferentes profundidades

no interior das membranas, foi possível a obtenção de informações acerca da fluidez nessas regiões.

Tem sido observado por vários autores [73, 74, 99-101] que na fase fluida os maiores efeitos de perturbação das membranas (quer sejam de aumento ou de diminuição da fluidez), pelos compostos hidrofóbicos, dão-se no centro da bicamada (próximo da sonda 12-AS) e em menor extensão na região das sondas 2-AS, 6-AS e 9-AS (de gradiente $2\text{-AS} < 6\text{-AS} < 9\text{-AS}$), também designada por planalto ("plateau"), sugerindo que esta região é estruturalmente mais estável e menos susceptível à perturbação.

Os dados experimentais corrigidos demonstraram que os anti-inflamatórios em estudo, com excepção do indoprofeno e do diclofenac, provocaram um aumento da fluidez membranar, tanto maior quanto maior a concentração dos mesmos. No entanto, enquanto que o indoprofeno não causou qualquer efeito a nível da fluidez membranar, o diclofenac enrijeceu a bicamada lipídica de uma forma dependente da concentração. A Tabela 3.10 contem os valores de r_{ss} obtidos experimentalmente e os respectivos valores corrigidos na presença de concentrações crescentes de indoprofeno.

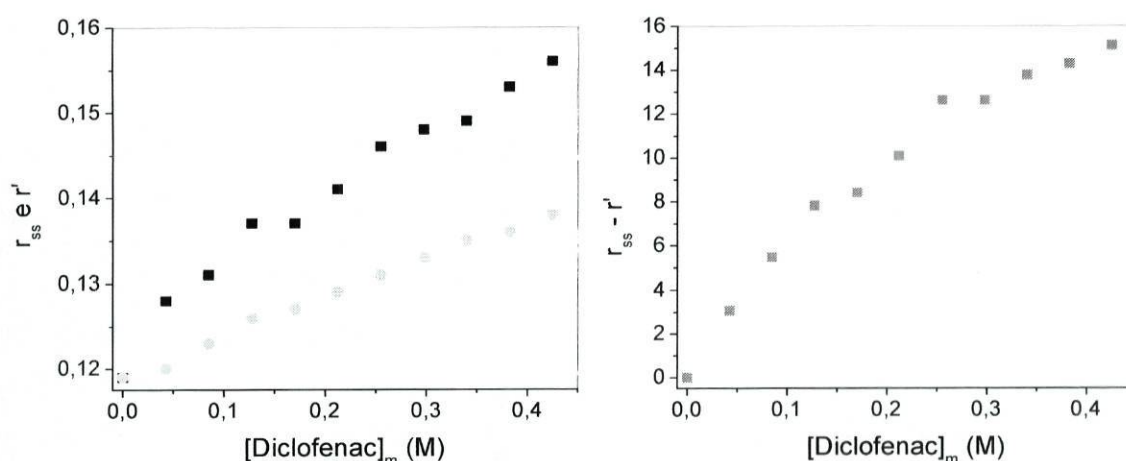


Figura 3.36: Valores de anisotropia corrigida, r' (○), e experimentais de estado estacionário, r_{ss} (■), e a resultante $r_{ss} - r'$ (■), para a sonda 2-AS incorporada em lipossomas unilamelares de EPC (500 μM), a pH igual a 7,4, na presença de concentrações membranares crescentes de diclofenac.

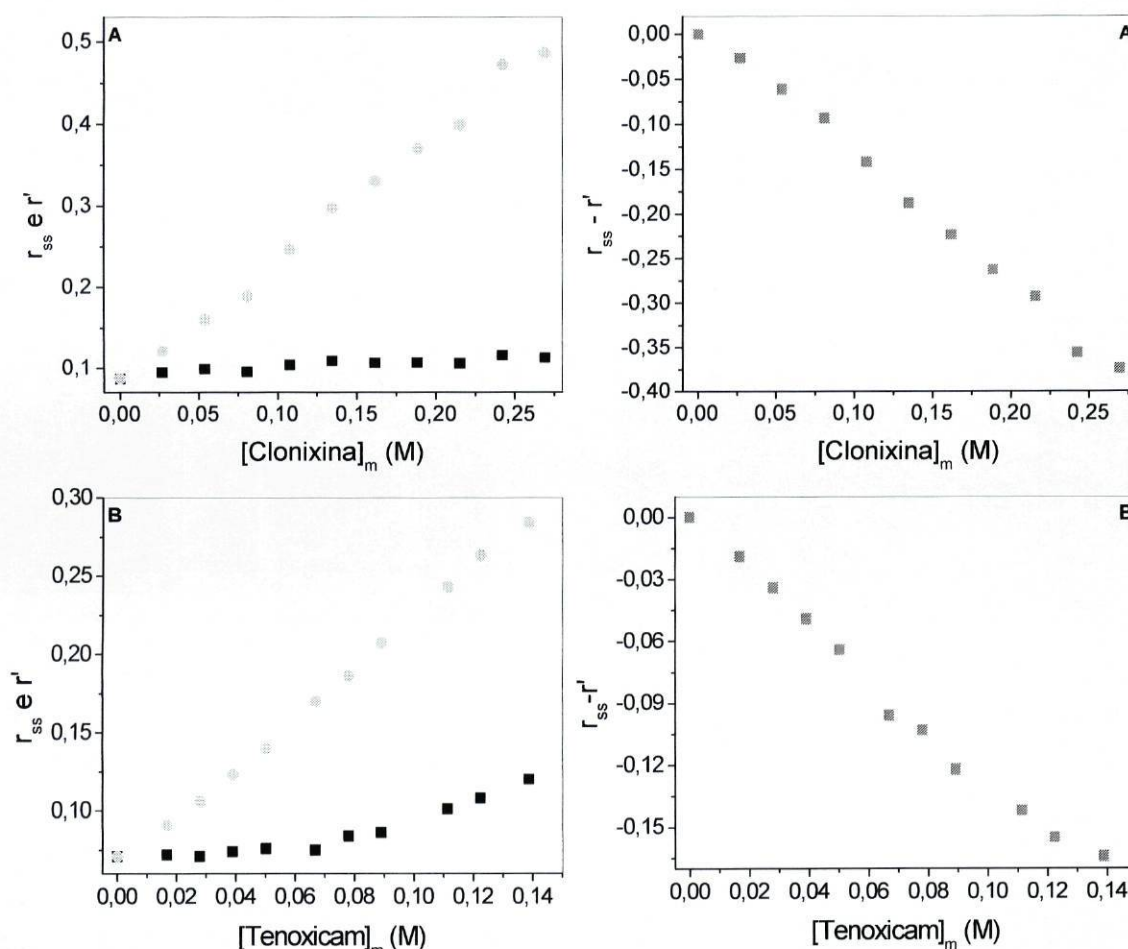


Figura 3.37: Valores de anisotropia corrigida, r' (●), e experimentais de estado estacionário, r_{ss} (■), e a resultante $r_{ss} - r'$ (■), para a sonda 12-AS incorporada em lipossomas unilamelares de EPC (500 μ M), a pH igual a 7,4, na presença de concentrações membranares crescentes de clonixina (A) e tenoxicam (B).

Os dados adquiridos para o indoprofeno são concordantes com os obtidos nos estudos anteriores, pois como a interacção do indoprofeno com a membrana lipídica não deve ser significativa, a um valor de pH igual a 7,4, não deveria ocorrer uma alteração mensurável da fluidez membrana. Um comportamento semelhante ao observado para o indoprofeno foi verificado para o etodolac, quando presente em concentrações inferiores a aproximadamente 120 μ M, pela mesma razão enunciada para o indoprofeno.

O diclofenac foi o único dos fármacos estudados capaz de provocar uma diminuição da fluidez membrana. No entanto, este efeito foi apenas observado para a sonda 2-AS, enquanto que para as outras sondas não se verificou uma perturbação evidente na microviscosidade membrana (Figura 3.38).

Tabela 3.10: Valores da anisotropia de estado estacionário experimentais, r_{ss} , e da anisotropia corrigida, r' , para as sondas n -AS incorporadas em lipossomas unilamelares de EPC (500 μ M), a pH igual a 7,4, na presença de concentrações crescentes de indoprofeno.

[Indoprofeno] (M x 10 ⁻⁴)	2-AS		6-AS		9-AS		12-AS	
	r_{ss}	r'	r_{ss}	r'	r_{ss}	r'	r_{ss}	r'
0	0,133	0,133	0,130	0,130	0,101	0,101	0,070	0,070
0,29	0,133	0,134	0,126	0,127	0,102	0,100	0,069	0,070
0,87	0,130	0,135	0,123	0,126	0,100	0,099	0,069	0,072
1,16	0,130	0,135	0,123	0,126	0,100	0,098	0,067	0,071
1,74	0,131	0,135	0,124	0,127	0,097	0,095	0,067	0,070
2,89	0,131	0,134	0,127	0,128	0,102	0,100	0,069	0,072
4,63	0,130	0,134	0,128	0,131	0,100	0,099	0,068	0,070
7,23	0,129	0,133	0,129	0,126	0,097	0,095	0,067	0,070

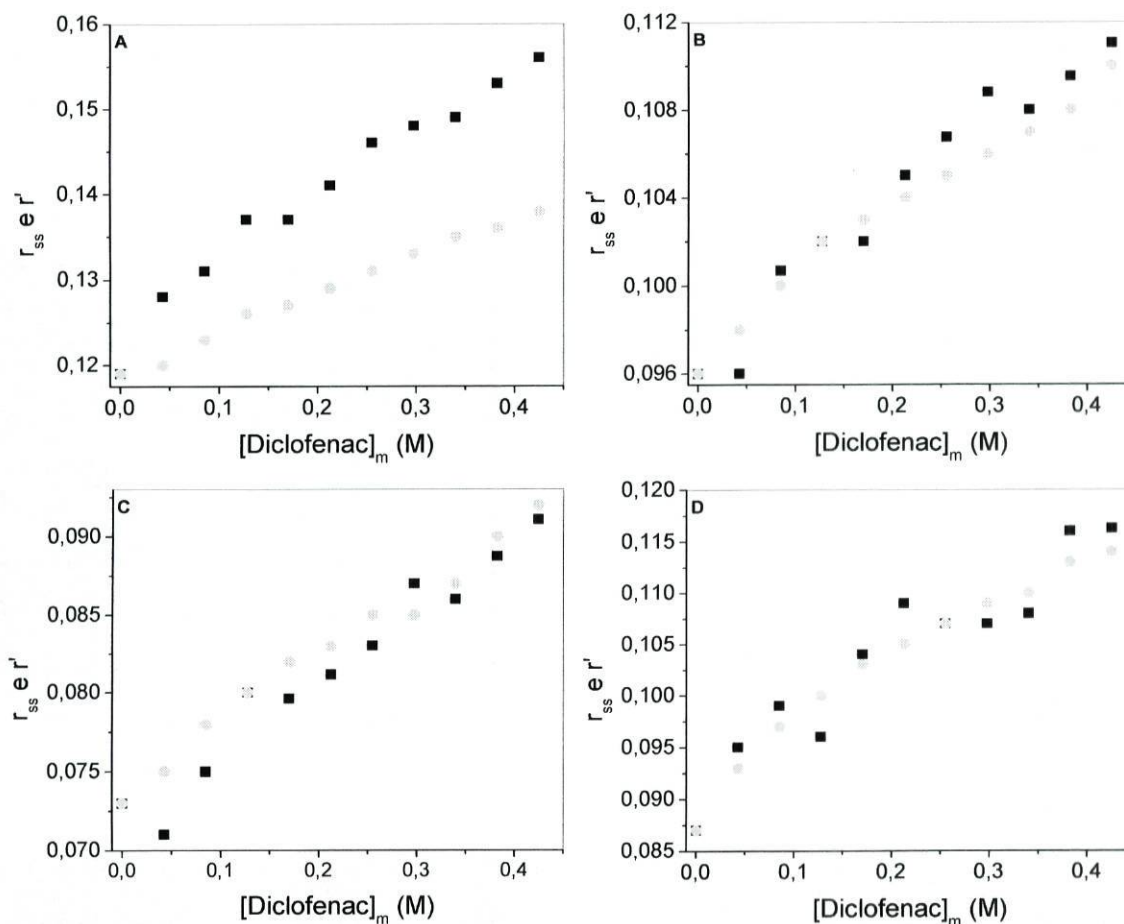


Figura 3.38: Valores de anisotropia corrigida, r' (○), e experimentais de estado estacionário, r_{ss} (■), para as sondas 2-AS (A), 6-AS (B), 9-AS (C) e 12-AS (D), incorporadas em lipossomas unilamelares de EPC (500 μ M), a pH igual a 7,4, na presença de concentrações efectivas crescentes de diclofenac.

Os efeitos do diclofenac na fluidez membranar são concordantes com os resultados obtidos nos estudos de localização. De facto, este fármaco aumentou a rigidez ao nível dos grupos polares dos fosfolípidos, o que está de acordo com a sua localização preferencial, que é na superfície da membrana. O comportamento observado pode ser explicado pelo facto de que na região onde este AINE se encontra localizado, deverá existir uma menor desordem, devido a um aumento na densidade de empacotamento, do que o verificado nas outras regiões da bicamada lipídica. No entanto, o anel benzénico cloro-substituído, apesar de estar provavelmente localizado ao nível da parte mais interna da membrana, não afecta significativamente a fluidez membranar dessa região. Este mesmo efeito foi observado para as sondas 6-AS e 9-AS, que fazem parte do planalto menos susceptível a perturbação.

Os AINEs clonixina, piroxicam, tenoxicam e etodolac, apresentaram, ao contrário dos fármacos anteriores, como já referido anteriormente, capacidade de fluidificação da membrana. As diferenças na potência destes compostos, no aumento da fluidez da membrana, reflectiram-se no valor dos seus IC_{25} , que são definidos como a concentração na fase membranar ($[Q]_m$ em M) de cada composto requerida para aumentar o efeito de fluidificação $[(r' - r_{ss}) / r'_0] \times 100$ em 25%. Estes valores de IC_{25} foram calculados através de regressões polinomiais de segunda ordem ($y = ax^2 + bx + 100$), uma vez que nem sempre se obteve uma relação linear entre o efeito de fluidificação em percentagem e a concentração do composto em estudo (Figura 3.39). No entanto, para o etodolac as concentrações apresentadas na Figura 3.39 correspondem às concentrações totais, uma vez que como a interacção deste AINE com a membrana não deve ser significativa, como já referido anteriormente, nas condições experimentais utilizadas para a determinação do valor de K_p , não se tornou possível quantificar tal interacção, cujo valor era necessário para o cálculo do valor de $[Q]_m$. Contudo, uma vez que o perfil de distribuição dos pontos percentuais de fluidificação é o mesmo quer se considere concentrações membranares ou totais (corroborado pela observação desse efeito com os fármacos clonixina, tenoxicam e piroxicam), torna-se na mesma possível a comparação dos resultados obtidos para o etodolac relativamente aos outros fármacos. De facto, pode-se concluir que o etodolac é o menos eficaz dos quatro fármacos referidos, pois o máximo efeito de fluidificação atingido é apenas aproximadamente igual a 9% (Figura 3.39). Assim, considerando este valor de percentagem de fluidificação obtido para o etodolac e supondo que a partir da concentração em que se observa desactivação de fluorescência por este fármaco, a sua partição era superior à máxima (por exemplo, $K_p = 2800$) ou inferior à

mínima (por exemplo, $K_p = 200$) dos fármacos em estudo, havia na mesma necessidade de concentrações membranares superiores às apresentadas pelos outros AINEs para provocarem um efeito de fluidificação comum de 9%. Complementarmente, se se observasse apenas as concentrações totais dos fármacos, também se chegaria à mesma conclusão.

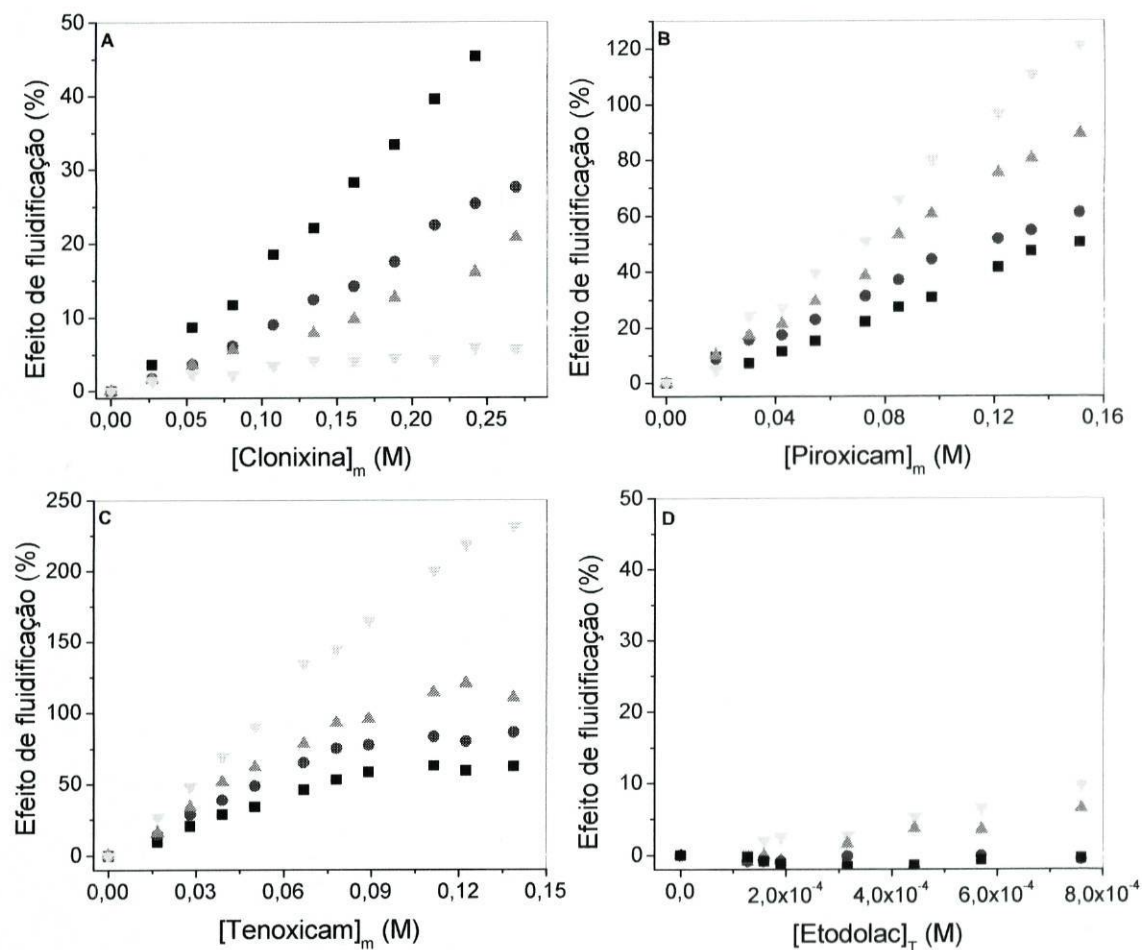


Figura 3.39: Efeito de fluidificação (%), para as sondas 2-AS (■), 6-AS (●), 9-AS (▲) e 12-AS (▼) incorporadas em lipossomas unilamelares de EPC (500 μ M), a pH igual a 7,4, causado por concentrações crescentes de clonixina (A), piroxicam (B), tenoxicam (C) e etodolac (D).

Os valores de IC_{25} , obtidos para os AINEs capazes de provocar um aumento da fluidez membranares, estão apresentados na Tabela 3.11.

Tabela 3.11: Valores de IC₂₅ dos AINEs clonixina, tenoxicam, piroxicam e etodolac determinados para cada sonda *n*-AS incorporada em LUVs de EPC (500 µM), a pH igual a 7,4. Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão dos resultados obtidos em três ensaios independentes.

AINEs	IC ₂₅			
	2-AS	6-AS	9-AS	12-AS
Clonixina	0,148 ± 0,076	0,238 ± 0,043	n. a.*	n. a.*
Diclofenac	Diminui fluidez	_____**	_____**	_____**
Tenoxicam	0,033 ± 0,003	0,023 ± 0,001	0,019 ± 0,004	0,014 ± 0,001
Piroxicam	0,084 ± 0,001	0,072 ± 0,008	0,058 ± 0,002	0,041 ± 0,002
Etodolac	_____**	_____**	n. a.*	n. a.*
Indoprofeno	_____**	_____**	_____**	_____**

*não atinge

**sem efeito nas condições experimentais estabelecidas

A observação da Tabela 3.11, permite ordenar os compostos em termos de eficácia na fluidificação membranar do seguinte modo: tenoxicam > piroxicam > clonixina > etodolac. De facto, o tenoxicam foi o AINE que se revelou mais eficaz no aumento da fluidez da membrana para todas as sondas *n*-AS. Adicionalmente, a análise dos resultados também mostra que a perturbação causada por estes fármacos não é a mesma a todas as profundidades da bicamada. Assim, a ordem observada nos diferentes graus de profundidade para a clonixina foi 2-AS > 6-AS > 9-AS > 12-AS, enquanto que para os oxicamos a ordem obtida foi contrária à anterior, ou seja, 12-AS > 9-AS > 6-AS > 2-AS, e finalmente para o etodolac a ordem obtida correspondeu a 12-AS ≥ 9-AS. Com efeito, o etodolac, ao contrário da clonixina, piroxicam e tenoxicam (que apresentaram comportamento semelhante ao apresentado na Figura 3.27 (A e B), para todas as sondas *n*-AS), apenas demonstrou capacidade fluidificante na localização das sondas 9-AS e 12-AS (Figuras 3.39 e 3.40). Ao nível do local onde as sondas 2-AS e 6-AS se encontravam localizadas, não ocorreu uma perturbação significativa da fluidez da membrana.

A eficácia demonstrada pelo etodolac está de acordo com os estudos acima referidos [73, 74, 99-101], e com os resultados obtidos nos estudos de localização. De facto, apesar do etodolac se encontrar ligado electrostaticamente pelo seu grupo carboxílico desprotonado à superfície polar da membrana, a sua presença nesta

posição mais superficial não parece influenciar a elevada ordem observada na região próxima das sondas 2-AS e 6-AS. No entanto, à medida que se vai avançando para uma maior profundidade na bicamada a susceptibilidade das regiões à perturbação vai aumentando, atingindo o seu máximo no centro da bicamada, próximo da localização da sonda 12-AS. Assim, nesta posição, já foi possível observar a capacidade do etodolac em aumentar a fluidez membranas.

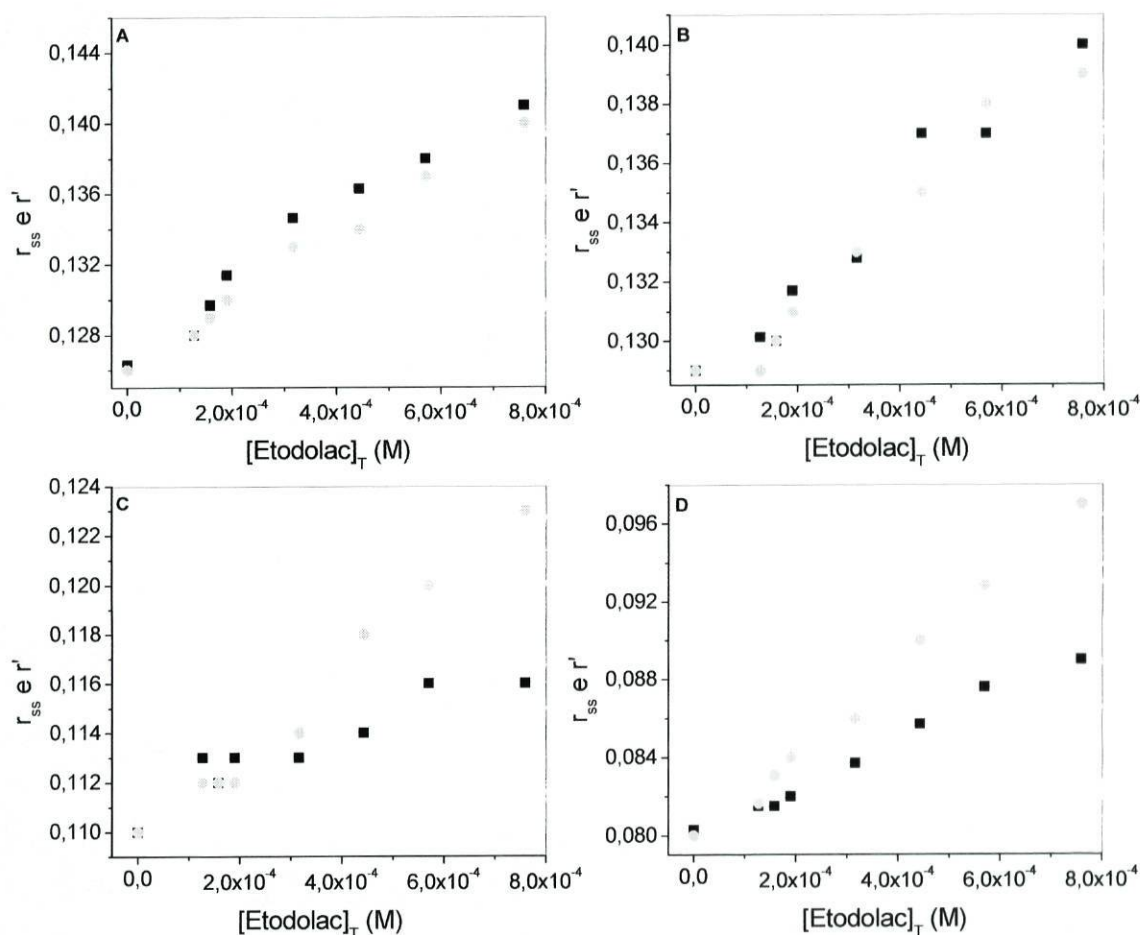


Figura 3.40: Valores de anisotropia corrigida, r' (●), e experimentais de estado estacionário, r_{ss} (■), para as sondas 2-AS (A), 6-AS (B), 9-AS (C) e 12-AS (D), incorporadas em lipossomas unilamelares de EPC (500 μ M), a pH igual a 7,4, na presença de concentrações crescentes de etodolac.

Os resultados obtidos para a clonixina estão de acordo com a sua eficácia de desactivação de fluorescência (que está relacionada com a sua localização na membrana). De facto, como o AINE referido parece estar preferencialmente localizado na proximidade da superfície polar membranas, o efeito fluidificante significativamente

maior a esse nível pode ser explicado por um aumento da área entre as moléculas lipídicas, uma vez que a clonixina se encontra electrostaticamente ligada aos grupos polares dos fosfolípidos. Assim, este AINE, como o diclofenac, embora com efeitos antagónicos, parece vencer a resistência à perturbação apresentada pela região onde se encontram localizadas as sondas 2-AS, 6-AS e 9-AS, com consequente fluidificação da mesma.

Finalmente, a ordem de eficácia ao nível das várias regiões membranares observada para os oxicamos, contrária à da clonixina, está de acordo com os estudos, anteriormente referidos, acerca da susceptibilidade da membrana à perturbação por um composto hidrofóbico [73, 74, 99-101]. Com efeito, apesar dos oxicamos e a clonixina apresentarem uma ordem de eficiência relativa de desactivação de fluorescência equivalente, o mesmo não se observa neste estudo de fluidez membranar, as quais são contrárias. Deste modo, enquanto que a clonixina se parece dispor de um modo capaz de contrariar os estudos referidos, os oxicamos apresentaram um comportamento que se identifica com o observado por esses vários autores.

Como conclusão, pode-se referir que os efeitos dos fármacos perturbadores da fluidez membranar estão dependentes quer da sua localização na bicamada, quer da susceptibilidade à perturbação da região da membrana que se está a considerar.

3.5. CONCLUSÃO

O trabalho realizado permitiu, não apenas quantificar a extensão da interacção dos AINEs com os lipossomas de EPC, mas também demonstrou que essa interacção é governada pela natureza química do composto farmacêutico, assim como pela composição das próprias membranas. Adicionalmente, possibilitou avaliar os efeitos dessa interacção nas propriedades físico-químicas da membrana, nomeadamente pelo estudo de alterações no potencial e fluidez membranar.

Dependendo das propriedades ácido-base e lipofilia de um fármaco, a interacção pode ocorrer em maior ou menor extensão. Assim, foi necessária a caracterização das constantes de acidez da clonixina, não encontradas na literatura, e do diclofenac, para o conhecimento dos parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos dos fármacos. De facto, a correcta avaliação do estado de ionização do fármaco nos diversos compartimentos fisiológicos contribui para um

conhecimento mais aprofundado do seu tempo de retenção no organismo, assim como da sua biodistribuição, uma vez que o estado de ionização de uma molécula afectará o seu transporte transmembranar. A sua actividade farmacológica poderá também estar dependente do equilíbrio de ionização, pois essa actividade está usualmente relacionada com reacções biológicas, como ligação ao local activo de enzimas (por exemplo, COX), que geralmente requerem apenas o fármaco na sua forma protonada ou desprotonada. Além disso, o conhecimento das propriedades ácido-base e da lipofilia dos fármacos permite ainda descrever o efeito da interacção destes com as membranas nas propriedades eléctricas da bicamada fosfolipídica e, assim, contribuem para uma melhor compreensão do seu mecanismo de acção e efeitos adversos.

A utilização de diversos métodos para a determinação do valor de K_p mostrou que os modelos matemáticos que apenas consideram a existência de duas fases distintas podem ser aplicados somente quando não são contabilizáveis fenómenos de cariz electrostático ou de saturação membranar. Assim, quando as vesículas ou os fármacos estudados não apresentam carga (interacções maioritariamente hidrofóbicas) ou quando a concentração do fármaco é suficientemente baixa para que não se observe saturação da membrana e/ou a carga conferida a esta, pela partição de um fármaco carregado (interacções com uma significativa contribuição electrostática), possa ser negligenciada, é indiferente a utilização da concentração na interface ou no seio da solução aquosa para o cálculo do coeficiente de partição. No entanto, para elevadas concentrações de fármaco carregado, a partição deste nos lipossomas cria um aumento na densidade de carga, e as repulsões electrostáticas não podem mais ser negligenciadas e apresentam um importante papel na partição de fármacos carregados. Neste caso, os coeficientes de partição devem ser calculados usando concentrações de fármaco na interface. Contudo, os valores de K_p obtidos por espectrofotometria UV/Vis, determinação do potencial-zeta ou desactivação de fluorescência para os AINEs clonixina e diclofenac foram concordantes para concentrações do fármaco na mesma ordem de grandeza.

Os valores de K_p obtidos, por espectrofotometria derivativa UV/Vis e desactivação de fluorescência, para os AINEs clonixina e diclofenac, presentes predominantemente na forma negativa a um valor de pH igual a 7,4, foram consideravelmente menores que os observados para os AINEs piroxicam e tenoxicam, os quais são iões dipolares estáveis ao valor de pH referido. Estes resultados são concordantes com outros estudos presentes na literatura [16, 55], onde é possível

verificar que uma maior partição ocorre quando as moléculas se encontram na sua forma mais hidrofóbica. Adicionalmente, esta observação também corrobora os resultados obtidos para os AINEs clonixina e diclofenac nos estudos de determinação do valor de K_p , por espectrofotometria derivativa de UV/Vis, a diferentes valores de pH (3,0, 7,4 e 10,3). Assim, a maior partição observada para o diclofenac, a um valor de pH igual a 3,0, está justamente relacionada com a presença maioritária da sua forma neutra (90,7%), enquanto que a menor partição obtida para a clonixina deve ser devida à repulsão electrostática entre as suas moléculas na forma positiva e os lipossomas de EPC também carregados positivamente, sendo, deste modo, a partição governada essencialmente pela sua forma dipolar presente em menor extensão (13,7%).

Por outro lado, estudou-se como a presença de colesterol (numa percentagem aproximadamente igual a 10 ou 40%), nos LUVs de EPC, poderia influenciar a partilha dos fármacos. Deste modo, observou-se que esse constituinte adicional diminui, de uma forma dependente da concentração, o coeficiente de partição dos AINEs clonixina e diclofenac. Estes resultados são concordantes com as funções desempenhadas pelo colesterol presente numa membrana fluída, como é o caso dos LUVs de EPC, a 25°C [18].

A determinação do valor de K_p , a um valor de pH igual a 7,4, no entanto, não foi possível para os AINEs indoprofeno e etodolac, uma vez que a interacção destes AINEs com a membrana não deve ser significativa. De facto, todos os estudos realizados apontam para que não haja uma interacção mensurável entre o indoprofeno e os LUVs de EPC, nas condições experimentais utilizadas, pois nunca se verificou uma alteração das características das sondas de fluorescência e das propriedades membranares estudadas. Quanto ao etodolac, a impossibilidade referida deve estar relacionada com a concentração usada deste AINE nestes ensaios, uma vez que apenas se obtem desactivação de fluorescência das sondas *n*-AS, em concentrações bastante superiores (aproximadamente o dobro) às usadas em espectrofotometria.

Os estudos efectuados para determinar a localização dos AINEs na membrana mostraram que os grupos carregados destes fármacos devem estar localizados na proximidade da parte polar da membrana, enquanto que o resto da molécula se deve interdigitar por entre as caudas dos fosfolípidos, penetrando profundamente na membrana fosfolipídica, o que segundo trabalhos de Fan *et al* [102] e Hwang *et al* [103] parece ser um requisito importante para a actividade anti-inflamatória.

Os resultados obtidos nos estudos de localização e partição são concordantes com os obtidos no estudo do potencial-zeta. Com efeito, o apreciável decréscimo dos valores de potencial-zeta provocado pelo diclofenac, clonixina e etodolac sugere que estes AINEs devam estar preferencialmente localizados com os seus grupos carregados na proximidade da superfície polar da bicamada lipídica. E, por outro lado, confirma que os AINEs referidos estão predominantemente carregados negativamente a um valor de pH igual a 7,4. Contudo, apesar desses fármacos se encontrarem em percentagens aproximadamente iguais na forma negativa, nomeadamente 99,9% para o diclofenac, 98,7% para a clonixina e 99,8% para o etodolac, foi possível verificar que a descida dos valores de potencial-zeta foi maior na presença do diclofenac, seguida da clonixina e consideravelmente menor para o etodolac, o que está de acordo com a extensão de partição observada para estes fármacos, que seguiu a mesma ordem ($K_p \text{ diclofenac} > K_p \text{ clonixina} > K_p \text{ etodolac}$). A observação de uma ligeira descida do potencial de membrana para concentrações de etodolac inferiores às necessárias para se poder observar partilha, pode ser justificada pela existência de fenómenos electrostáticos, os quais complementam frequentemente os fenómenos de partição simples.

Para além destes dados experimentais permitirem descrever o efeito da interacção dos fármacos nas propriedades electrostáticas da bicamada lipídica, possibilitaram também a determinação da quantidade de fármaco na membrana e, consequentemente, a caracterização da extensão do equilíbrio de partição dos AINEs diclofenac e clonixina, como referido anteriormente. A menor influência sobre o potencial de membrana observada para os oxicamos piroxicam e tenoxicam é também coerente com a presença predominante das formas dipolares em solução aquosa, a um valor de pH igual a 7,4. Deste modo, é possível concluir que os resultados apresentados são também concordantes com a percentagem das formas dos fármacos existentes em equilíbrio, ao valor de pH em consideração. Esta relação foi também verificada para os AINEs diclofenac e clonixina na medição do potencial-zeta dos LUVs de EPC, a um valor de pH igual a 3,0. De facto, a este valor de pH não houve alteração dos valores de potencial-zeta positivos da membrana, o que está em concordância com a presença predominante das formas neutras de diclofenac (90,7%) e das formas positivas (86,7%) e dipolares (13,7%) da clonixina.

Finalmente, as alterações na fluidez membranar pelos AINEs reflectem as suas eficiências de desactivação de fluorescência (o que está relacionado com a sua localização no interior da membrana), uma vez que um fármaco, preferencialmente localizado no interior das bicamadas lipídicas, poderá apresentar, provavelmente, uma

maior capacidade de perturbação na ordem dos lípidos circundantes, do que um fármaco mais hidrofílico. Deste modo, os resultados obtidos também estão de acordo com a extensão de partição observada para cada AINE. Contudo, enquanto que os AINEs tenoxicam, piroxicam, clonixina e etodolac demonstraram capacidade para aumentar a fluidez membranar, o diclofenac, pelo contrário, foi capaz de provocar uma diminuição da fluidez da membrana. Quanto ao indoprofeno, não foi possível observar nenhum efeito a nível desta propriedade física membranar. De facto, em todos os estudos realizados não se obteve nenhum resultado que sugerisse a ocorrência de interacção entre este AINE e os lipossomas de EPC, a um valor de pH igual a 7,4, como referido anteriormente.

Além de analisar as diferenças entre os AINEs no que respeita à sua capacidade para perturbar a membrana lipídica, foi também possível comparar os resultados obtidos para cada sonda, já que como estas estão localizados em diferentes locais da membrana, podem fornecer indicações sobre a microviscosidade dessas regiões. Os resultados obtidos são concordantes com a localização preferencial dos AINEs na bicamada e, adicionalmente, com a região da membrana que está a ser considerada, uma vez que estas têm diferentes susceptibilidades à perturbação.

Do exposto se depreende a importância do estudo da interacção ao nível molecular dos fármacos com os lipossomas, que é determinante para a compreensão dos parâmetros de distribuição dessas moléculas no organismo, bem como para o estabelecimento de relações estrutura-actividade, os quais constituem parâmetros fundamentais para o desenvolvimento de fármacos cada vez mais eficazes.

Neste contexto, este trabalho contribuiu para o conhecimento exaustivo da interacção entre os fármacos e as membranas lipídicas, caracterizada quantitativamente pela determinação de coeficientes de partição e qualitativamente pela elucidação da natureza da referida interacção e da localização dos fármacos nas membranas lipídicas. Adicionalmente, a avaliação das alterações em diferentes características físico-químicas das membranas, resultantes dessa interacção, constituiu também um aspecto fundamental, uma vez que quer as propriedades electrostáticas, quer a fluidez membranar podem afectar as propriedades biofísicas e actividade da membrana e, consequentemente, a actividade de enzimas membranares e de uma série de processos celulares, o que, por sua vez, pode estar directamente relacionado com as acções terapêuticas dos AINEs.

3.6. BIBLIOGRAFIA

1. Vane, J. R. (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature*, 231: 232-235.
2. Herschman, H. R. (1996). Prostaglandin synthase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1299: 125-140.
3. Brooks, P. (1998). Use and Benefits of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs. *Am. J. Med.*, 104: 9S-13S.
4. Brooks, P. M., Day, R. O. (1991). Nonsteroidal antinflammatory drugs-differences and similarities. *New Engl. J. Med.*, 324: 1716-1725.
5. Klein, T., Ullrich, V., Pfeilschifter, J., Nüsing, R. (1998). On the induction of Cyclooxygenase-2, inducible nitric oxid synthase and soluble phospholipase A₂ in rat mesangial cells by a nonsteroidal anti-inflammatory drug: the role of cyclic AMP. *Mol. Pharmacol.*, 53: 385-391.
6. Knazek, R. A., Liu, S. C., Dave, J. R., Christy, R. J., Keller, J. A. (1981). Indomethacin causes a simultaneous decrease of both prolactin binding and fluidity of mouse liver membranes. *Prostag. Med.*, 6: 403-411.
7. Beccerica, E., Piergiacomini, G., Curatola, G., Ferretti, G. (1989). Effect of antirheumatic drugs on lymphocyte membrane fluidity in rheumatoid arthritis: a fluorescence polarization study. *Pharmacology*, 38: 16-22.
8. Beccerica, E., Ferretti, G., Curatola, G., Cervini, C. (1990). Diacetylrhein and rhein: in vivo and in vitro effect on lymphocyte membrane fluidity. *Pharmacol. Res.*, 22: 277-285.
9. Bomalaski, J. S., Hirata, F., Clarke, M. A. (1986). Aspirin inhibits phospholipase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 139: 115-121.
10. Luger, P., Daneck, K., Engel, W., Trummelitz, G., Wagner, K. (1996). Structure and physicochemical properties of meloxicam, a new NSAID. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 4: 175-187.
11. Engelhardt, G., Homma, D., Schlegel, K., Schnitzler, C., Utmann, R. (1996). General Pharmacology of Meloxicam-Part I: Effects on CNS, Gastric Emptying, Intestinal Transport, Water, Electrolyte and Creatinine Excretion. *Gen. Pharmacol.*, 27: 673-677.
12. Distel, M., Mueller, C., Bluhmki, E. (1996). Selective inhibition of human cyclooxygenase-2 by meloxicam. *Inflammopharmacology*, 4: 71-81.

13. Kitamura, K., Imayoshi, N. (1992). Second-Derivative Spectrophotometric Determination of the Binding Constant Between Chlorpromazine and Cyclodextrin in Aqueous Solutions. *Anal. Sci.*, 8: 497-501.
14. Kitamura, K., Imayoshi, N., Goto, T., Shiro, H., Mano, T., Nakai, Y. (1995). Second Derivative Spectrophotometric Determination of Partition Coefficients of Chlorpromazine and Promazine Between Lecithin Bilayer Vesicles and Water. *Anal. Chim. Acta*, 304: 101-106.
15. Castro, B., Gameiro, P., Lima, J. L. F. C., Matos, C., Reis, S. (2001). Location and partition coefficients of antiinflammatory drugs in EPC liposomes. A fluorescence quenching study using n-(9-antroyloxy)-stearic probes. *Colloids Surf., A*, 190: 205-212.
16. Castro, B., Gameiro, P., Lima, J. L. F. C., Matos, C., Reis, S. (2001). A fast and reliable spectroscopic method for the determination of membrane-water partition coefficients of organic compounds. *Lipids*, 36: 89-96.
17. Betageri, G. V., Rogers, J. A. (1988). The liposome as a distribution model in QSAR studies. *Int. J. Pharm.*, 46: 95-102.
18. Lasic, D. D. (1993). *Liposomes - from Physics to Applications*. Elsevier. New York.
19. Manson, R. P., Rhodes, D. G., Herbette, L. G. (1991). Reevaluating equilibrium and kinetic binding parameters for lipophilic drugs based on a structural model for drug interaction with biological membranes. *J. Med. Chem.*, 34: 869-877.
20. New, R. R. C. (1990). *Liposomes - a practical approach*. Oxford University Press. New York.
21. Matos, C., Castro, B., Gameiro, P., Lima, J. L. F. C., Reis, S. (2004). Zeta potential measurements as a tool to quantify the effect of charged drugs on the surface potential of egg phosphatidylcholine liposomes. *Langmuir*, 20: 369-377.
22. Eisenberg, M., Gresalfi, T., Riccio, T., MacLaughlin, S. (1979). Adsorption of monovalent cations to bilayer membranes containing negative phospholipids. *Biochemistry*, 18: 5213-5223.
23. Lacowicz, J. R. (1999). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 2nd ed. Kluwer Academic/ Plenum Press. New York.
24. Kaiser, R. D., London, E. (1998). Location of diphenylhexatriene (DPH) and its derivatives within membranes: comparison of different fluorescence quenching analysis of membrane depth. *Biochemistry*, 37: 8180-8190.

25. Russel, A. J., Fersht, A. R. (1987). Rational modification of enzyme catalysis by engineering surface charge. *Nature*, 328: 496-500.
26. Volwerk, J. J., Jost, P. C., de Haas, G. H., Griffith, O. H. (1986). Activation of porcine pancreatic phospholipase A₂ by the presence of negative charges at the lipid-bilayer interface. *Biochemistry*, 25: 1726-1733.
27. McLaughlin, S. (1989). The electrostatic properties of membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, 18: 113-136.
28. Cevc, G. (1990). Membrane electrostatics. *Biochim. Biophys. Acta*, 1131: 311-382.
29. McLaughlin, S., Harary, H. (1976). The Hydrophobic adsorption of charged molecules to bilayer membranes: a test of the applicability of the Stern equation. *Biochemistry*, 15: 1941-1948.
30. Ohki, S. (1984). Adsorption of local anesthetics on phospholipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 777: 56-66.
31. McLaughlin, S. (1973). Salicylates and phospholipid bilayer membranes. *Nature*, 243: 234-236.
32. Barker, J. L., Levitan, H. (1971). Salicylate: effect on membrane permeability of molluscan neurons. *Science*, 172: 1245-1247.
33. MacDonald, T. M., Morant, S. V., Robinson, G. C., Shield, M. J., McGilchrist, M. M., Murray, F. E., McDevitt, D. G. (1997). Association of upper gastrointestinal toxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs with the continued exposure: cohort study. *BMJ*, 315: 1333-1337.
34. Scherer, P. G., Seelig, J. (1989). Electric charge effects on phospholipid headgroups. Phosphatidylcholine in mixtures with cationic and anionic amphiphiles. *Biochemistry*, 28: 7720-7728.
35. Wiseman, H., Cannon, M., Arnestein, H. R. V., Barlow, D. J. (1992). The structural mimicry of membrane sterols by tamoxifen: evidence from cholesterol coefficients and molecular-modelling for its action as a membrane anti-oxidant and anti-cancer agent. *Biochim. Biophys. Acta*, 138: 197-202.
36. Horan, K. L., Lutzke, B. S., Cazars, A. R., McCall, J. M., Epps, D. E. (1994). Kinetic evaluation of lipophilic inhibitors of lipid peroxidation in DLPC liposomes. *Free Rad. Biol. Med.*, 17: 587-596.
37. Cervato, G., Viani, P., Masserini, M., Di Iorio, C., Cestaro, B. (1988). Studies on peroxidation of arachidonic acid in different liposomes below and above phase transition temperature. *Chem. Phys. Lipids*, 49: 135-139.

38. Simonetti, O., Ferretti, G., Offidani, A. M., Gervasi, P., Curatola, G., Bossi, G. (1996). Plasma membrane fluidity of keratinocytes of normal and psoriatic skin: A study using fluorescence anisotropy of trimethylammoniumdiphenylhexatriene (TMA-DPH). *Arch. Dermatol. Res.*, 288: 51-54.
39. Lehr, H. A., Zimmer, J. P., Hubner, C., Reisinger, E. C., Kohlschutter, A., Schmitz, H. (1991). Dextran sulphate reduces diphenylhexatriene anisotropy in human peripheral blood lymphocytes: Impact on plasma membrane fluidity and HIV-cytopathogenicity. *J. Antimicrob. Chemother.*, 28: 677-680.
40. Clarke, R., Van den Berg, H. W., Murphy, R. F. (1990). Reduction of the membrane fluidity of human breast cancer cells by tamoxifen and 17 beta-estradiol. *J. Natl. Cancer Inst.*, 82: 1702-1705.
41. Lúcio, M., Ferreira, H., Lima, J. L. F. C., Matos, C., Castro, B., Reis, S. (2004). Influence of some anti-inflammatory drugs in membrane fluidity studied by fluorescence anisotropy measurements. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 6: 1493-1498.
42. Engelke, M., Bojarski, P., Blob, R., Diehl, H. (2001). Tamoxifen perturbs lipid bilayer order and permeability: Comparison of DSC, fluorescence anisotropy, Laurdan generalized polarization, and carboxyfluorescein leakage studies. *Biophys. Chem.*, 90: 157-173.
43. Wiseman, H., Quinn, P., Halliwell, B. (1993). Tamoxifen and related compounds decrease membrane fluidity in liposomes. *FEBS Lett.*, 330: 53-56.
44. Thulborn, K. R., Treolar, F. E., Sawyer, W. H. (1978). A microviscosity barrier in the lipid bilayer due to the presence of phospholipids containing unsaturated acyl chains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 81: 42-49.
45. Albert, A., Serjeant, E. P. (1971). The determination of ionization constants. Chapman and Hall, 2^a edition, London.
46. Seok, Y., Yang, K., Kang, S. (1995). A simple spectrophotometric determination of dissociation constants of organic compounds. *Anal. Chim. Acta*, 306: 351-356.
47. Buck, R. P., Cosofret, V. (1993). Recommended procedures for calibration of ion-selective electrodes. *Pure Appl. Chem.*, 65: 1849-1858.
48. Martell, A. E., Motekaitis, R. J. (1988). Determination and use of stability constants. VCH. Weinheim.
49. Hartley, F. R., Burgess, C., Alcock, R. M. (1980). Solution equilibria. Ellis Horwood Limited. England.

50. Gans, P., Sabatini, A., Vacca, A. (1999). Determination of Equilibrium Constants from Spectrophotometric Data Obtained from Solutions of Known pH: the Program PHAB. *Anal. Chim.*, 89: 45-49.
51. Takács-Novák, K., Avdeef, A., Box, K. J., Podányi, B., Szász, G. (1994). Determination of protonation macro- and microconstants and octanol/water partition coefficient of the anti-inflammatory drug niflumic acid. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 11: 1369-1377.
52. Owen, A. J. (1998). Quantitative UV-visible analysis in the presence of scattering. *Spectrosc. Eur.*, 10: 26-28.
53. Welti, R., Mullikin, L. J., Yoshimura, T., Helmkamp Jr, G. M. (1984). Partition of Amphiphilic Molecules into Phospholipid Vesicles and Human Erythrocyte Ghosts: Measurements by Ultraviolet Difference Spectroscopy. *Biochemistry*, 23: 6086-6091.
54. Gürsoy, A., Senyücel, B. (1997). Characterization of Ciprofloxacin Liposomes: Derivative Ultraviolet Spectrophotometric Determinations. *J. Microencapsulation*, 14: 769-776.
55. Castro, B. d., Gameiro, P., Lima, J. L. F. C., Matos, C., Reis, S. (2001). Interaction of drugs with hexadecylphosphocholine micelles. Derivative spectroscopy, acid-base and solubility studies. *Mat. Sci. Eng., C*, 18: 71-78.
56. Rojas, F. S., Ojeda, C. B., Pavon, J. M. C. (1988). Derivative ultraviolet-visible region absorption spectrophotometry and its analytical applications. *Talanta*, 35: 753-761.
57. Wenk, M. R., Fahr, A., Reszka, R., Seelig, J. (1996). Paclitaxel Partitioning into Lipid Bilayers. *J. Pharm. Sci.*, 85: 228-231.
58. White, S. H., Jacobs, R. E., King, G. I. (1987). Partial specific volumes of lipid and water in mixtures of egg lecithin and water. *Biophys. J.*, 52: 663-665.
59. Ferreira, H., Lúcio, M., Castro, B., Gameiro, P., Lima, J. L. F. C., Reis, S. (2003). Partition and location of nimesulide in EPC liposomes: a spectrophotometric and fluorescence study. *Anal. Bioanal. Chem.*, 377: 293-298.
60. Ferreira, H., Lúcio, M., Lima, J. L. F. C., Matos, C., Castro, B., Reis, S. (2005). Effects of diclofenac on EPC liposome membrane properties. *Anal. Bioanal. Chem.*, 382: 1256-1264.

61. Ferreira, H., Lúcio, M., Lima, J. L. F. C., Matos, C., Castro, B., Reis, S. (2005). Interaction of clonixin with EPC liposomes used as membrane models. *J. Pharm. Sci.*, 94: 1277-1287.
62. Winiski, A. P., Eisenberg, M., Langner, M., McLaughlin, S. (1988). Fluorescent probes of electrostatic potential 1 nm from the membrane surface. *Biochemistry*, 27: 386-392.
63. Westman, J., Boulanger, Y., Ehrenberg, A., Smith, I. C. P. (1982). Charge and pH dependent binding to model membranes. A ^2H -NMR and light absorption study. *Biochem. Biophys. Acta*, 685: 315-328.
64. Wallwork, S. C., Grant, D. J. (1977). Physical chemistry for students of Pharmacy and Biology. Longman Group Limited. London.
65. Rooney, E. K., East, J. M., Jones, O. T., McWhieter, J., Simmonds, A. C., Lee, A. G. (1983). Interaction of fatty acids with lipid bilayers. *Biochem. Biophys. Acta*, 728: 159-170.
66. Connors, K. A. (1987). Binding constants. The measurement of molecular complex stability. Series. John Wiley & Sons. New York.
67. Chalpin, D. B., Kleinfeld, A. M. (1983). Interaction of fluorescence quenchers with the *n*-(9-anthroyloxy) fatty acid membrane probes. *Biochim. Biophys. Acta*, 731: 465-474.
68. Sikaris, K. A., Sawyer, W. H. (1982). The interaction of local anaesthetics with synthetic phospholipid bilayers. *Biochem. Pharmacol.*, 31: 2625-2631.
69. Coutinho, A., Prieto, M. (1993). Ribonuclease T1 and alcohol dehydrogenase fluorescence quenching by acrylamide. *J. Chem. Educ.*, 70: 425-428.
70. Blatt, E., Sawyer, W. H. (1985). Depth-dependent fluorescent quenching in micelles and membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 822: 43-62.
71. Haigh, E. A., Thulborn, K. R., Sawyer, W. H. (1979). Comparison of fluorescence energy transfer and quenching methods to establish the position and orientation of components within the transverse plane of the lipid bilayer. Application to the gramicidin A-bilayer interaction. *Biochemistry*, 18: 3525-3532.
72. Thulborn, K. R., Sawyer, W. H. (1978). Properties and the locations of a set of fluorescent probes sensitive to the fluidity gradient of the lipid bilayer. *Biochim. Biophys. Acta*, 511: 125-140.
73. Thulborn, K. R., Tilley, L. M., Sawyer, W. H., Treloar, F. E. (1979). The use of *n*-(9-anthroyloxy) fatty acids to determine fluidity and polarity gradients in phospholipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta*, 558: 166-178.

74. Tilley, L. M., Thulborn, K. R., Sawyer, W. H. (1979). An assessment of the fluidity gradient of the lipid bilayer as determined by a set of *n*-(9-anthroyloxy) fatty acids ($n = 2, 6, 9, 12, 16$). *J. Biol. Chem.*, 254: 2592-2594.
75. Villalain, J., Prieto, M. (1991). Location and interaction of *n*-(9-anthroyloxy)-stearic acid probes incorporated in phosphatidylcholine vesicles. *Chem. Phys. Lipids*, 59: 9-16.
76. Abrams, F. S., London, E. (1993). Extension of the parallax analysis of membrane penetration depth to the polar region of model membranes: use of fluorescence quenching by a spin-label attached to the phospholipid polar headgroup. *Biochemistry*, 32: 10826-10831.
77. Eisinger, J., Flores, J. (1983). Cytosol-membrane interface of human erythrocytes. A resonance energy transfer study. *Biophys. J.*, 41: 367-379.
78. Cabrini, G., Verkman, A. S. (1986). Localization of cyanine dye binding to brush-border membranes by quenching of *n*-(9-anthroyloxy) fatty acid probes. *Biochim. Biophys. Acta*, 862: 285-293.
79. Dupou-Cézanne, L., Sautereau, A. M., Tocanne, J. F. (1989). Localization of adriamycin in model and natural membranes. Influence of lipid molecular packing. *Eur. J. Biochem.*, 181: 695-702.
80. Katsikas, H., Quinn, P. J. (1983). Fluorescence probe studies of the distribution of ubiquinone homologues in bilayers of dipalmitoylglycerophosphocholine. *Eur. J. Biochem.*, 131: 607-612.
81. Gazzara, J. A., Phillips, M. C., Lund-Katz, S., Palgunachari, M. N., Segrest, J. P., Anantharamaiah, G. M., Rodriguez, W. V., Snow, J. W. (1997). Effect of vesicle size on their interaction with class A amphipathic helical peptides. *J. Lipid Res.*, 38: 2147-2154.
82. Vincent, M., de Foresta, B., Gallay, J., Alfsen, A. (1982). Nanosecond fluorescence anisotropy decays of *n*-(9-anthroyloxy) fatty acids in dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles with regard to isotropic solvents. *Biochemistry*, 21: 708-716.
83. Shinitzky, M., Barenholz, Y. (1978). Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization. *Biochim. Biophys. Acta*, 515: 367-394.
84. Johns, S. R., Willing, R. I., Thulborn, K. R., Sawyer, W. H. (1979). ¹³C NMR studies on fluorescent probes: ¹³C chemical shifts and longitudinal relaxation times of *n*-hydroxy-fatty ($n=2, 6, 9, 12$) acids and *n*-(9-anthroyloxy)-stearic ($n=6, 12$) acids. *Chem. Phys. Lipids*, 24: 11-16.

85. Huang, C., Thompson, T. E. (1974). Preparation of homogeneous, single-walled phosphatidylcholine vesicles. *Methods Enzymol.*, 32: 485-489.
86. Gran, G. (1952). Determination of the equivalence point in potentiometric titrations. Part II. *Analyst*, 77: 661-671.
87. Reis, M. S. F. F. H. (1995). Ácidos biliares e actividade biológica. Alguns aspectos da relação entre a estrutura química e as propriedades físico-químicas. Dissertação de Doutoramento. Departamento de Química-Física. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.
88. Sigel, H., Zuberbühler, A. D. (1991). Comments on potentiometric pH titrations and the relationship between pH-meter reading and hydrogen ion concentration. *Anal. Chim. Acta*, 255: 63-72.
89. Castanho, M., Prieto, M., Acuña, A. U. (1996). The transverse location of the fluorescent probe trans-parinaric acid in lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta*, 1279: 164-168.
90. Coutinho, A., Costa, J., Faria, J. L., Berberan-Santos, M. N., Prieto, M. J. E. (1990). Dibucaine interaction with phospholipid vesicles. A resonance energy-transfer study. *Eur. J. Biochem.*, 69: 2541-2557.
91. Moreno, M. J., Prieto, M. (1993). Interaction of the peptide hormone adrenocorticotropin ACTH (1-24), with a membrane model system: a fluorescence study. *Photochem. Photobiol.*, 57: 431-437.
92. Kiselev, M. A., Lesieur, P., Kisilev, A. M., Gabrielle-Madmond, C., Ollivon, M. (1999). DMSO-induced dehydration of DPPC membranes studied by X-ray diffraction, small-angle neutron scattering, and calorimetry. *J. Alloys Compd.*, 286: 195-202.
93. Balon, K., Riebesehl, B. U., Müller, B. W. (1999). Determination of liposome partitioning of ionizable drugs by titration. *J. Pharm. Sci.*, 88: 802-806.
94. Braun, R. D. (1987). Introduction to Instrumental analysis. McGraw-Hill International Editions. New York.
95. Hansch, C., Leo, A., Hoekman, D. (1995). Exploring QSAR hydrophobic electronic and stearic constants. American Chemical Society: Washington, DC.
96. Kyrikou, I., Hadjikakou, S. K., Kovala-Demertzi, D., Viras, K., Mavromoustakos, T. (2004). Effects of non steroid anti-inflammatory drugs in membrane bilayers. *Chem. Phys. Lipids*, 132:157-169.
97. Lee, Y. J., Padula, J., Lee, H. K. (1988). Kinetics and mechanisms of etodolac degradation in aqueous solutions. *J. Pharm. Sci.*, 77: 81-86.

98. Lúcio, M., Ferreira, H., Lima, J. L. F. C., Reis, S. (2006). Interactions between oxicams and membrane bilayers - an explanation for their different COX selectivity. *Med. Chem.*, 2: 447-456.
99. Kutchai, H., Chandler, L., Zavoico, G. B. (1983). Effects of cholesterol on acyl chain dynamics in multilamellar vesicles of various phosphatidylcholines. *Biochim. Biophys. Acta*, 736: 137-149.
100. Seelig, J., Seelig, A. (1980). Lipid conformation in model membranes and biological membranes *Q. Rev. Biophys.*, 13: 19-61.
101. Zavoico, G. B., Chandler, L., Kutchai, H. (1985). Perturbation of egg phosphatidylcholine and dipalmitoylphosphatidylcholine multilamellar vesicles by n-alkanols. A fluorescent probe study. *Biochim. Biophys. Acta*, 812: 299-312.
102. Fan, S. S., Shen, T. Y. (1981). Membrane effects of antiinflammatory agents. 1. Interaction of sulindac and its metabolites with phospholipid membrane, a magnetic resonance study. *J. Med. Chem.*, 24: 1197-1202.
103. Hwang, S., Shen, T. Y. (1981). Membrane effects of antiinflammatory agents. 2. Interaction of nonsteroidal antiinflammatory drugs with liposome and purple membranes. *J. Med. Chem.*, 24: 1202-1211.

CAPÍTULO 4

**AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS
ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTERÓIDES**

CAPÍTULO 4. AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTERÓIDES

4.1 INTRODUÇÃO

A inflamação, fenómeno basicamente defensivo, conduz à produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e de azoto (RNS), cuja libertação incontrolada provoca danos nas células [1-3]. As ROS são produzidas durante a resposta inflamatória, como consequência da actividade das enzimas ciclooxigenase (COX) [4] e lipoxigenase [5]. Outra importante fonte destas espécies reactivas e de RNS, na inflamação, são as células endoteliais, células de Kupffer, neutrófilos e macrófagos, que as produzem como um mecanismo de defesa face a agentes patogénicos estranhos ou infecciosos [6]. Contudo, a contínua sobreprodução de ROS e RNS, e/ou a diminuição das defesas antioxidantes, pode contribuir para o desenvolvimento de várias doenças, como cancro, artrite reumatóide, aterosclerose e envelhecimento [7]. Assim, muita atenção tem sido direccionada para a avaliação da actividade antioxidante dos anti-inflamatórios não esteróides (AINEs). De facto, a capacidade antioxidante dos AINEs poderá actuar em sinergia com os seus reconhecidos efeitos na inibição da actividade das enzimas ciclooxigenase e lipoxigenase [8, 9], no tratamento da inflamação. Adicionalmente, a actividade antioxidante, demonstrada por este grupo de fármacos, pode ser importante no tratamento de outras enfermidades, onde as espécies reactivas de oxigénio desempenham um importante papel. Com efeito, tem sido sugerido por vários autores o uso de AINEs em outras doenças, como por exemplo, cancro, Alzheimer e aterosclerose [7, 10].

Neste trabalho, realizaram-se vários estudos para a avaliação da actividade antioxidante dos AINEs face a diferentes radicais livres e também relativamente a um mesmo radical gerado em diferentes locais, nomeadamente na fase aquosa e no interior da membrana. Estes estudos foram realizados *in vitro*, uma vez que as

reacções, destinos e consequências dos radicais livres, em sistemas biológicos são, em geral, tão complexos que os estudos em modelos simplificados são, usualmente, requeridos. Assim, e tendo em conta que as membranas são, frequentemente, o primeiro alvo dos danos oxidativos nos sistemas biológicos, devido, especialmente, à presença de fosfolípidos polinsaturados, foram realizados estudos para a avaliação da peroxidação lipídica em modelos membranares. Para a realização dos diferentes estudos, utilizaram-se lipossomas unilamelares (LUVs) de fosfatidilcolina da gema de ovo (EPC), os quais constituem excelentes modelos das membranas biológicas, uma vez que mimetizam a sua estrutura química e anisotrópica.

Muitos trabalhos, existentes na literatura, sobre a peroxidação lipídica usaram lipossomas multilamelares (MLVs) como modelos membranares. Entre eles, Barclay e Ingold [11] sugeriram que a velocidade da reacção de propagação da peroxidação nas bicamadas era lenta, quando comparada com a obtida com os lípidos dispersos em solução. Contudo, Barclay et al. [12] e Yamamoto et al. [13] descreveram que a oxidabilidade dos ácidos gordos insaturados nas membranas era similar à que ocorria em solução homogénea. Finalmente, Barclay et al. [14] sugeriram que a oxidabilidade dos LUVs era maior do que a dos MLVs. Apesar da discrepância observada na literatura, é possível afirmar que os LUVs são mais facilmente oxidáveis do que as vesículas multilamelares ou os lípidos dispersos em solução. A maior magnitude de peroxidação lipídica, após iniciação por um oxidante, observada em LUVs *versus* lípidos dispersos em solução não é surpreendente, uma vez que os lípidos fortemente empacotados na bicamada devem promover reacções de propagação em maior número que os lípidos dispersos em solução [15]. Esta observação está de acordo com outros resultados publicados, que referem que o linoleato de metilo, quando incorporado num sistema micelar, é menos oxidável do que em lipossomas de fosfatidilcolina [15]. O maior factor envolvido na diferença observada nos estudos que forneceram evidências de que os lipossomas eram, em geral, menos oxidáveis do que os lípidos em solução [11], deve estar relacionado com a configuração do lipossoma usado para a obtenção desses resultados. De facto, as vesículas multilamelares são multi-compartimentalizadas, e os radicais peróxido lipídicos presentes numa bicamada não serão capazes de trocar eficazmente com as outras bicamadas, para a propagação da peroxidação lipídica, uma vez que a velocidade relativa de troca é muito lenta [16]. Deste modo, a peroxidação lipídica iniciada a partir de um oxidante gerado no meio envolvente das membranas, irá apenas peroxidar a bicamada externa dos MLVs, a menos que a sua estrutura seja completamente destruída. Em contraste,

os LUVs proporcionam um sistema mais simples para as reacções de propagação da peroxidação lipídica, pois, após a sua iniciação, todos os lípidos se encontram na mesma bicamada e, assim, igualmente susceptíveis de serem oxidados. Com efeito, é possível encontrar na literatura numerosos resultados experimentais que demonstram que os LUVs são excelentes modelos das membranas biológicas para o estudo da peroxidação lipídica [5, 15, 17-24]. Por outro lado, as biomembranas consistem apenas em uma estrutura unilamelar e são continuamente atacadas por radicais livres gerados na fase aquosa das fracções celular e subcelulares, o que faz com que os LUVs, ao contrário dos MLVs, consigam mimetizar, de uma forma mais eficiente, a peroxidação lipídica que ocorre ao nível das biomembranas.

Os LUVs de composição e tamanho uniformizado, e na ausência de níveis detectáveis de oxidantes existentes no ar, podem ser rapidamente e eficientemente preparados por extrusão. Adicionalmente, moléculas orgânicas podem ser incorporadas na bicamada dos LUVs, em concentrações razoáveis, sem provocar significantes distúrbios na estabilidade dos lipossomas [16]. Deve-se, no entanto, referir que a sonicação não constitui um processo adequado para a obtenção de LUVs para os ensaios de oxidação, uma vez que este procedimento leva à produção de uma considerável quantidade de hidroperóxidos lipídicos na bicamada [25, 26].

Este estudo utilizou, assim, LUVs como alvos da oxidação para a avaliação da actividade antioxidante e para a compreensão dos mecanismos de acção dos AINEs etodolac, piroxicam, tenoxicam, clonixina, diclofenac e indoprofeno em relação à peroxidação lipídica. De facto, a similaridade entre os lipossomas e as membranas biológicas faz dos lipossomas uma ferramenta útil, para investigar quão significantes são as interacções antioxidante-lípido para a actividade antioxidante.

A actividade antioxidante dos AINEs, poderá estar relacionada não apenas com as suas características estruturais, mas também com a sua capacidade para interagir e penetrar na membrana. Assim, poderão existir mecanismos alternativos de acção dos AINEs relativamente à peroxidação lipídica, que não envolvem a captura dos radicais oxidantes, mas nos quais há uma modificação das propriedades membranares, pelos compostos em estudo, que impede a propagação da oxidação. Com efeito, existe na literatura referência a compostos que apresentam actividade antioxidante sem serem consumidos durante o processo de peroxidação lipídica [27]. De facto, é bem conhecida a existência de uma relação entre a capacidade dos compostos em modificar a fluidez da membrana, com a sua actividade antioxidante na peroxidação lipídica [19, 20]. A mera presença dos compostos na bicamada lipídica,

pode modificar, numa extensão significativa, as propriedades físico-químicas da membrana. Estas modificações podem produzir efeitos secundários que complementam favoravelmente ou até mesmo promovem as desejadas características de captura dos radicais livres. Assim, um agente eficaz contra os radicais livres pode actuar tanto pela captura desses radicais, como também pela alteração das propriedades da membrana celular, de um tal modo, que a reacção em cadeia da peroxidação lipídica seja incapaz de se propagar eficientemente. Este último mecanismo, puramente físico-químico, tem sido postulado como o responsável pelo efeito antioxidante observado para o colesterol e seus derivados [28, 29]. Contudo, esta capacidade não se verifica apenas para compostos capazes de diminuir a fluidez membranar, como o colesterol, mas também para fármacos capazes de a aumentar. De facto, o efeito de fluidificação ou desordenação provocado por um fármaco na bicamada, resultante da sua interacção com os lípidos, pode favorecer a captura de radicais livres pelo fármaco em questão, por tornar a interacção das suas moléculas com os radicais lipídicos mais eficiente [30].

A actividade antioxidante pode desempenhar-se, essencialmente, por dois mecanismos, nomeadamente pela inibição da iniciação da peroxidação lipídica ou através da interrupção dessa reacção em cadeia. Deste modo, os antioxidantes dividem-se em dois grandes grupos de acordo com o seu mecanismo de acção: os antioxidantes “preventivos”, que correspondem àqueles que inibem ou retardam a formação dos radicais livres a partir dos seus precursores instáveis ou impedem o seu ataque à membrana (iniciação), e os antioxidantes de “quebra-cadeia”, os quais interrompem a reacção em cadeia iniciada pelo radical (propagação). Nestes mecanismos, a reacção entre o radical livre e o antioxidante deverá ocorrer mais rapidamente do que com o substrato oxidável (como, por exemplo, os fosfolípidos polinsaturados) e levar à formação de um radical mais estável, que não deve ter capacidade para continuar a reacção em cadeia [31].

Para estudar a peroxidação lipídica e a sua inibição quantitativa é necessário e essencial gerar radicais livres numa proporção conhecida e constante, e, preferencialmente, num local específico. Os radicais livres podem ser gerados por vários métodos, tais como irradiação, decomposição de hidroperóxidos ou peróxido de hidrogénio (H_2O_2) por adição de iões metálicos, ou decomposição térmica ou fotoquímica de compostos iniciadores. Os radicais iniciadores incluem peróxidos, hiponitritos e compostos azo. Assim, e tendo em conta que os mais frequentemente utilizados para iniciar as reacções radicalares em cadeia nas bicamadas de modelos

membranares são os iniciadores azo, utilizaram-se, neste estudo, o dicloridrato de 2,2'-azobis-2-amidinopropano (AAPH) e o 2,2'-azobis (2,4-dimetilvaleronitrilo) (AMVN) como geradores de radicais peroxilo ($\text{ROO}^\bullet$). Os dois iniciadores referidos apresentam lipossolubilidades distintas e, conseqüentemente, torna-se possível avaliar a eficácia antioxidante dos AINES quando os mesmos radicais são gerados na fase aquosa e no interior da bicamada lipídica, respectivamente, pelo AAPH e AMVN. Reconhecidamente, tais compostos não estão presentes nos sistemas biológicos, mas, contudo, constituem ferramentas úteis para estudar quantitativamente quer os danos induzidos pelos radicais livres nas membranas (peroxidação lipídica), quer a inibição da peroxidação lipídica por acção de antioxidantes. Os compostos azo têm, ainda, a vantagem, ao contrário dos peróxidos, de não serem explosivos e poderem ser manuseados facilmente e em segurança. Adicionalmente, também se utilizou o sistema oxidativo $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ (ião ferro (II)/peróxido de hidrogénio) para avaliar a actividade antioxidante dos vários AINES estudados face à peroxidação lipídica iniciada pelos radicais hidroxilo ($\text{HO}^\bullet$).

As espécies reactivas de oxigénio, como os radicais peroxilo e hidroxilo, são fortes agentes oxidantes e têm a capacidade de remover um átomo de hidrogénio a outras moléculas. Esta reacção constitui uma reacção muito importante na peroxidação lipídica, a qual corresponde, como referido anteriormente, a uma reacção em cadeia constituída por três etapas: iniciação, propagação e terminação. Assim, o ataque dessas espécies reactivas ($\text{X}^\bullet$) a ácidos gordos polinsaturados (LH), presentes nas bicamadas fosfolipídicas, inicia a peroxidação lipídica, pela formação do radical alquilo ($\text{L}^\bullet$), a partir da perda de um hidrogénio alílico pelos LH (equação 4.1).



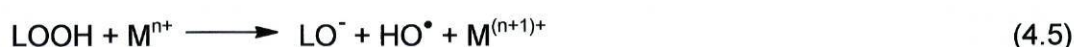
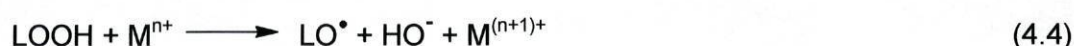
Os radicais alquilo, em condições aeróbias, reagem rapidamente com o oxigénio (O_2) para originar os radicais peroxilo lipídicos ($\text{LOO}^\bullet$; equação 4.2).



Os radicais peroxilo lipídicos propagam o processo de oxidação, pela remoção de um átomo de hidrogénio a um outro ácido gordo polinsaturado vizinho [27], gerando-se um hidroperóxido e outro radical de carbono (equação 4.3).



A decomposição dos peróxidos orgânicos pode originar novas espécies radicalares ($\text{LOO}^\bullet$, $\text{LO}^\bullet$ (radical alcóxido) e $\text{HO}^\bullet$), que irão contribuir para a iniciação de novos processos de peroxidação. Em sistemas biológicos, esta decomposição ocorre sobretudo pela acção de metais de transição (M) segundo reacções do tipo Fenton (equações 4.4, 4.5 e 4.6) [5, 32].



A reacção em cadeia prossegue através dos radicais peróxido lipídicos, que são os responsáveis pela fase de propagação da peroxidação lipídica, até à sua terminação. A peroxidação lipídica termina pela reacção bimolecular dos radicais peróxido lipídicos ou alquilo, ou ainda entre estas duas espécies reactivas, com formação de produtos estáveis.

Neste contexto, uma molécula reactiva de oxigénio pode provocar a conversão de centenas de ácidos gordos em hidroperóxidos lipídicos. A acumulação destes, na membrana celular, altera a sua função podendo mesmo fazer com que esta colapse, originando morte celular. Os hidroperóxidos lipídicos podem ainda decompor-se, originando uma variedade de compostos citotóxicos entre os quais se destacam os aldeídos, como o malonildialdeído e o 4-hidroxinonenal [33, 34], que podem, então, comportar-se como segundos mensageiros dos danos oxidativos. Assim, por exemplo, os $\text{LOO}^\bullet$ e os aldeídos citotóxicos podem provocar danos nas proteínas membranares, inactivando receptores, transportadores e enzimas ligadas à membrana [35]. Por estes motivos, a peroxidação lipídica tem sido referida como a causa e efeito dos processos patológicos dependentes dos radicais de oxigénio [36-38].

Das três fases da peroxidação lipídica indicadas - iniciação, propagação, e terminação - a menos compreendida é a iniciação, especialmente no contexto celular. Em particular, a identidade dos oxidantes que iniciam a peroxidação lipídica e os locais e mecanismos de iniciação são controversos. O iniciador mais citado é o radical

hidroxilo, um oxidante extremamente reactivo com praticamente todas as moléculas orgânicas. Tem um tempo de vida muito curto, mas é capaz de provocar grandes danos nas moléculas vizinhas, como por exemplo, ácidos nucleicos, proteínas e fosfolípidos, localizadas a poucos nanómetros do seu local de produção [3, 39].

O radical hidroxilo pode ser gerado, em sistemas biológicos, a partir do anião superóxido (O_2^-) e/ou ser um produto de dismutação do H_2O_2 pela reacção de Fenton ou Haber-Weiss [3, 15]. Contudo, a actividade do radical $HO^\bullet$, *in vivo*, como um iniciador da peroxidação lipídica é um tanto controversa. Realmente, a extrema reactividade do radical $HO^\bullet$, pode advogar contra o facto desta espécie actuar como um iniciador directo da peroxidação lipídica, visto que este poderoso oxidante reagirá, naturalmente, com a primeira molécula que esteja em contacto. Assim, parece ser necessário a geração desses radicais no interior da bicamada para ocorrer a peroxidação dos lípidos membranares [15]. Um mecanismo alternativo, que tem sido sugerido para a iniciação da peroxidação pelo radical $HO^\bullet$, é através de um mecanismo indirecto, no qual a extracção de um hidrogénio a partir de uma origem carbonada (R-H), pelo radical hidroxilo, geraria um radical de carbono, que rapidamente reagiria com uma molécula de oxigénio, originando um radical peroxilo difusível. Estes, sim, parecem ser importantes iniciadores da peroxidação lipídica *in vivo* [15, 40]. Assim, têm sido realizados estudos para avaliar a capacidade dos oxidantes derivados do oxigénio em iniciar a peroxidação lipídica, através de sistemas experimentais nos quais a identidade dos oxidantes é conhecida [15]. Os resultados obtidos mostraram que os oxidantes com capacidade de iniciar a peroxidação lipídica, nomeadamente os radicais $ROO^\bullet$, $HOO^\bullet$ (radical perhidroxilo) e $HO^\bullet$, foram capazes de ter acesso à funcionalidade reactiva do lípido para iniciar a peroxidação lipídica, quando gerados no meio envolvente dos lipossomas. Outros oxidantes, como por exemplo, H_2O_2 , $ROOH$ (hidroperóxido orgânico), $HOCl$ (ácido hipocloroso) e O_2^- não eram capazes de iniciar a peroxidação lipídica ou possuíam apenas uma reactividade fraca. Adicionalmente, também se verificou que os radicais hidroxilo, não obstante a sua capacidade de iniciação da peroxidação lipídica, apresentavam uma menor eficácia de iniciação quando comparados com os radicais peroxilo, apesar destes últimos serem quimicamente oxidantes mais fracos. Este resultado levou alguns autores a presumirem que havia necessidade de gerar o radical $HO^\bullet$, pela reacção de Fenton, na superfície dos lipossomas, para ocorrer a iniciação [15]. Esta observação determinava que o acesso ao meio lipídico pelo radical $HO^\bullet$ era um factor

determinante para a sua reactividade. Contudo, outros trabalhos demonstraram que a menor eficiência do radical $\text{HO}^\bullet$ em iniciar a peroxidação não era devida à necessidade da sua produção na superfície membranar, uma vez que a eficiência de iniciação foi igualmente menor comparativamente aos radicais $\text{ROO}^\bullet$ e $\text{HOO}^\bullet$, quando os LUVs eram dispersos pela acção de detergentes [15]. Preferivelmente, essa menor eficácia deve estar relacionada com o facto desse oxidante reagir e gerar espécies menos viáveis de propagação da peroxidação lipídica [15]. Assim, e enquanto os radicais $\text{ROO}^\bullet$ e $\text{HOO}^\bullet$ reagem com os lípidos para gerar os “clássicos” propagadores $\text{LOO}^\bullet$ (embora o mecanismo seja diferente, enquanto que o radical $\text{ROO}^\bullet$ remove um átomo de hidrogénio alílico, seguido da adição de O_2 , o radical $\text{HOO}^\bullet$ reage mais eficientemente com os LOOHs preexistentes), o radical $\text{HO}^\bullet$ produz menos de 10% dessas espécies de propagação. De facto, o radical hidroxilo parece ter capacidade para reagir com os ácidos gordos polinsaturados em vários locais, ao longo das suas cadeias hidrocarbonadas [15]. De acordo com alguns estudos, o principal modo de ataque do radical $\text{HO}^\bullet$ ao ácido linoleico era por adição às duplas ligações e apenas menos do que 5% dos produtos de reacção correspondiam a derivados formados pela remoção de átomos de hidrogénio alílicos [15]. Aparentemente, as espécies radicalares “não clássicas”, formadas pela reacção do radical $\text{HO}^\bullet$ com os lípidos, apresentam menor capacidade de conduzir as reacções de propagação da peroxidação lipídica e/ou terminam mais rapidamente. Deste modo, de acordo com o referido até ao momento, para o radical hidroxilo iniciar a peroxidação lipídica com toda a eficiência, deveria ser formado não apenas no interior da bicamada lipídica (a partir de H_2O_2 ou ROOH , os quais podem difundir para dentro das membranas), mas adjacente a átomos de hidrogénio alílicos. No entanto, para o radical $\text{HO}^\bullet$ ser produzido a partir de H(R)OOH , era necessário que os metais de transição também estivessem presentes na fase lipídica. Schaich e Borg [41] demonstraram que quelatos de EDTA com o ião ferro (II) (Fe^{2+}) ou ião ferro (III) (Fe^{3+}), representativos dos complexos de ferro catalisadores da reacção de Fenton, eram pouco solúveis no interior da fase lipídica das micelas formadas pelo ácido linoleico, e com complexos mais solúveis, a formação de $\text{HO}^\bullet$ dentro da fase lipídica era duvidosa. Além disso, o potencial redox, e, por conseguinte, a capacidade catalítica inerente aos complexos de metal iria diferir significativamente entre a solução aquosa e o meio lipídico. Adicionalmente, apesar dos complexos metálicos poderem catalizar a reacção de

Fenton na superfície da membrana, ainda não foi demonstrada a presença de metais nesta localização em células e tecidos [15].

Neste trabalho, como já referido, estudou-se a peroxidação lipídica induzida pelos radicais peroxilo gerados por decomposição térmica do AAPH e do AMVN e pelos radicais hidroxilo gerados pelo sistema $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$, em lipossomas unilamelares. Este estudo foi possível através da monitorização da oxidação de sondas fluorescentes, nomeadamente a fluoresceína, a 5-hexadecanoilaminofluoresceína (HDAF) e o ácido 3-(*p*-(6-fenil)-1,3,5-hexatrienil)fenilpropiónico (DPH-PA), por fluorescência e/ou anisotropia de fluorescência. Como as sondas referidas apresentavam localizações distintas relativamente à membrana lipídica, foi ainda possível investigar a actividade antioxidante dos vários AINES a esses diferentes níveis.

Na Figura 4.1 é possível observar, esquematicamente, a localização das sondas fluoresceína, HDAF e DPH-PA relativamente à membrana lipídica, assim como os seus estados de ionização predominantes a pH fisiológico (valor de pH igual a 7,4). Assim, e enquanto a fluoresceína se encontra dissolvida na solução aquosa [42, 43], a HDAF, que é um derivado dessa, possui a parte susceptível de oxidação na superfície polar da membrana. De facto, a presença de uma cadeia hidrocarbonada ligada à molécula de fluoresceína, permite ancorar a sonda assim constituída (HDAF) à membrana. Deste modo, as moléculas aromáticas possuidoras de carga e grupos polares estão localizadas na superfície polar da bicamada lipídica, enquanto que a cadeia hidrocarbonada se encontra alinhada com as cadeias hidrofóbicas dos fosfolípidos [44]. Finalmente, a sonda DPH-PA, sendo um derivado aniónico da sonda DPH (1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno), apresenta as suas duplas ligações conjugadas localizadas no interior da bicamada [45]. De facto, o efeito da derivatização da sonda DPH, pela ligação de um grupo com carga, não tem como resultado uma grande alteração na profundidade do grupo DPH [45]. Assim, a localização da sonda DPH-PA (com um grupo carboxílico ionizável) pode ser explicada pelo comprimento do grupo DPH e a tendência deste para se orientar paralelamente às cadeias hidrofóbicas presentes na bicamada [45].

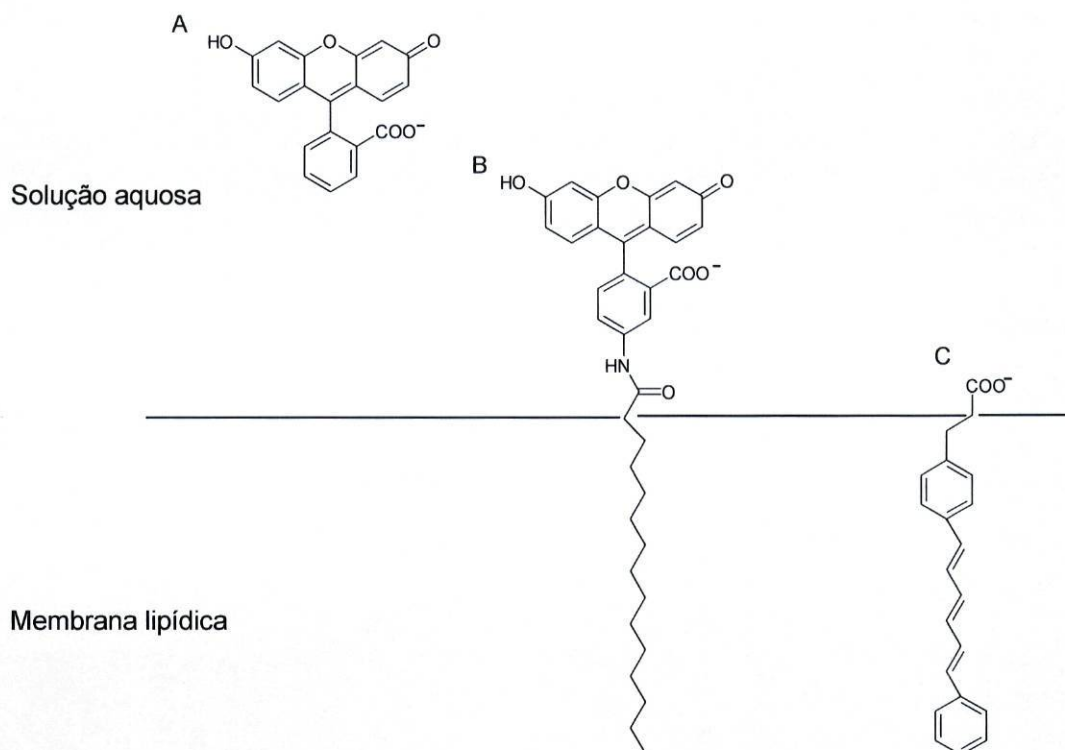


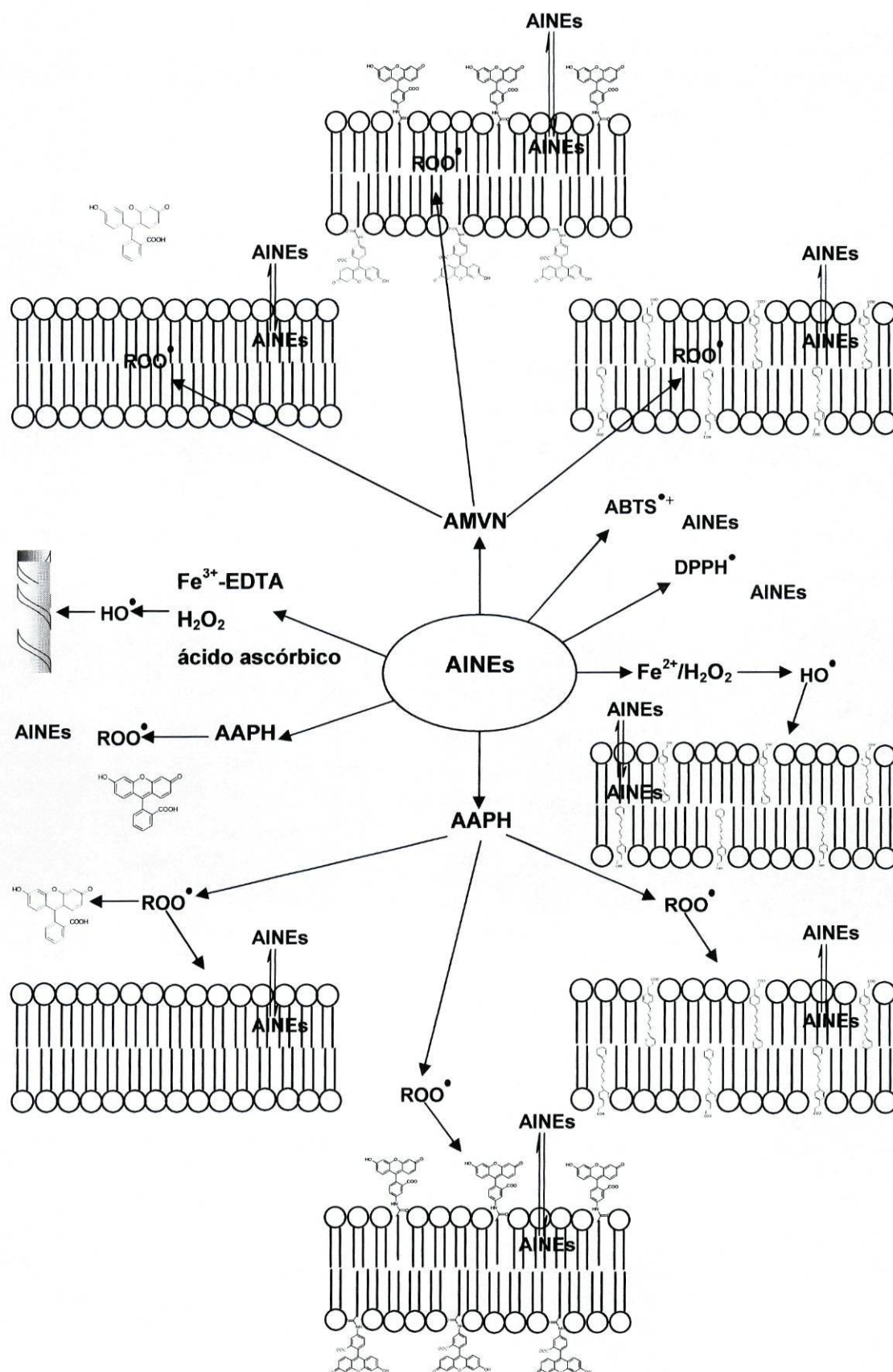
Figura 4.1: Estrutura química, localização e estados de ionização das sondas fluoresceína (A), HDAF (B) e DPH-PA (C) relativamente à membrana lipídica, a pH igual a 7,4.

O estudo para avaliação da actividade antioxidante dos AINEs também se efectuou na presença de outras espécies radicalares. Assim, a capacidade de captura destes fármacos foi determinada face aos radicais estáveis do ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) e do 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH), em solução etanólica. Estes ensaios de descoloração permitem, de um modo rápido e fácil, avaliar a actividade antioxidante de compostos lipofílicos e hidrofílicos [46].

Além do estudo da actividade antioxidante dos AINEs na inibição da peroxidação lipídica ou no impedimento da ocorrência de danos causados por radicais livres, foi ainda avaliado se este grupo de fármacos era capaz de proteger as biomoléculas de ADN dos danos oxidativos. A acumulação progressiva de danos oxidativos no ADN parece ser responsável pelo desenvolvimento de várias doenças (por exemplo, cancro e neurodegeneração) e pode ainda ser crítica para o processo de envelhecimento. Um dos indicadores mais usados para a avaliação do dano oxidativo do ADN é a 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OH-2'-dG), a qual pode ser produzida, por exemplo, pela acção de radicais hidroxilo ou singuleto de oxigénio [38]. Assim, neste estudo, foi usada a base 2'-desoxiguanosina (2'-dG), para avaliar a

capacidade dos AINEs na inibição da oxidação desta base do ADN a 8-OH-2'-dG, pelo radical hidroxilo gerado pelo sistema Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 /ácido ascórbico. Adicionalmente, a realização deste mesmo ensaio na ausência de ácido ascórbico permitiu avaliar a capacidade pró-oxidante dos AINEs em estudo, ou seja, se estes fármacos eram capazes de induzir a oxidação do ADN. A reacção do radical $\text{HO}^\bullet$ com a 2'-dG ocorre por adição do radical hidroxilo à sua molécula, produzindo uma modificação química que pode originar mutações, uma vez que possibilita a indução do desprendimento da base ou a quebra da cadeia do ADN [7].

Do exposto se depreende que para estabelecer o modo de acção de um antioxidante não é apenas importante o estudo da actividade antioxidante face a vários radicais livres, mas também a avaliação dessa actividade quando um determinado radical ($\text{ROO}^\bullet$) é gerado em diferentes locais, nomeadamente no interior da membrana ou na fase aquosa, e na presença de sondas fluorescentes com diferentes lipossolubilidades. É possível visualizar, de uma forma esquematizada, todos os estudos realizados neste trabalho no seguinte esquema:



4.2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4.2.1. Avaliação da capacidade de captação dos radicais $\text{ABTS}^{\bullet+}$ e $\text{DPPH}^{\bullet}$ por espectrofotometria UV/Vis

Os ensaios de descoloração baseados na redução dos radicais $\text{ABTS}^{\bullet+}$ e $\text{DPPH}^{\bullet}$ a ABTSH e $(\text{DPPH})\text{H}$ (Figuras 4.2 e 4.3) permitem uma análise fácil e rápida da actividade antiradicalar dos AINES.

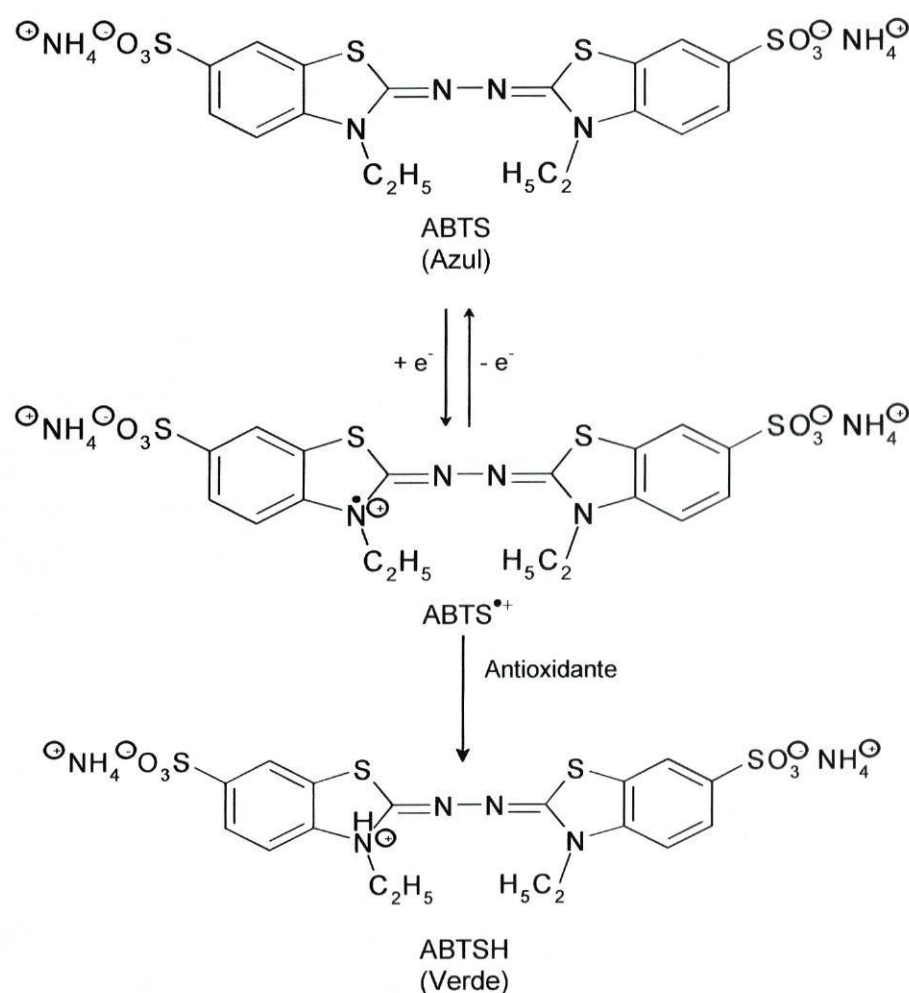


Figura 4.2: Estrutura química do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ e da respectiva espécie não radicalar, após reacção com compostos antioxidantes (adaptado de [47]).

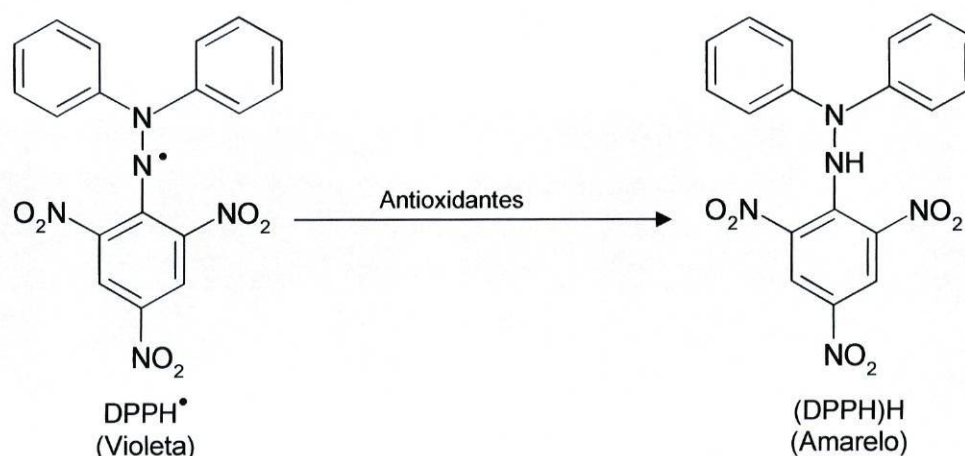


Figura 4.3: Estrutura química do radical DPPH[•] e da respectiva espécie não radicalar, após reacção com compostos antioxidantes (adaptado de [48]).

Nestes estudos, os compostos a testar são adicionados aos radicais pré-formados e não a um sistema onde ocorre a formação dos mesmos. Desta forma, os resultados obtidos estão directamente relacionados com a actividade antioxidante dos fármacos face aos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}, e não com uma possível inibição da formação dos mesmos, o que constituía uma desvantagem, por exemplo, no ensaio mioglobina/ABTS inicialmente muito usado [46, 49]. Com efeito, o método de descoloração, usado neste estudo, claramente aperfeiçoou o ensaio mioglobina/ABTS, pois a formação do radical ABTS^{•+} ocorre sem o envolvimento de um radical intermediário, além do facto do radical ABTS^{•+} não ser gerado continuamente na presença dos antioxidantes, mas antes ser adicionado ao sistema após a sua produção, como já referido.

A actividade antioxidante de um composto face aos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}, depende da sua capacidade em doar um átomo de hidrogénio ou um electrão a esses radicais [50]. Deste modo, os radicais, designados por R[•], podem reagir com os compostos, denominados de AH, por dois mecanismos diferentes: a) por transferência de um átomo de hidrogénio (H; equação 4.7) e b) por transferência de um electrão (equação 4.8).



A ocorrência de um ou do outro mecanismo depende da natureza do solvente e/ou do potencial de oxidação-redução das espécies envolvidas. O processo no qual há transferência de um átomo de hidrogénio do antioxidante para o radical é, geralmente, o predominante em solventes apolares e depende da entalpia de dissociação desse átomo de H à molécula do antioxidante, enquanto que o mecanismo que envolve a transferência de electrões parece predominar em solventes polares (como o etanol) e depende do potencial de ionização das espécies envolvidas [50-52].

Tem sido proposto que um composto com características antioxidantes deve possuir uma baixa energia de ligação O-H, para facilitar a doação do átomo de H ao radical, através do mecanismo presente na equação 4.7 [53]. Adicionalmente, tem sido sugerido que quantos mais grupos hidroxilo uma molécula tiver, maior será a sua eficácia face aos radicais estudados [49, 54]. A actividade antioxidante, por sua vez, será maior se na molécula estiverem presentes além dos grupos -OH outros grupos doadores de hidrogénio, como por exemplo, -NH e -SH. Pelo contrário, a presença de grupos captadores de electrões (como por exemplo -COOH e -Cl) e/ou a ausência de grupos doadores de electrões poderá explicar uma menor actividade antioxidante.

Os antioxidantes irão reduzir os radicais pré-formados a (DPPH)H e ABTSH numa extensão e num intervalo de tempo que depende da capacidade antioxidante, da concentração do antioxidante e da duração da reacção. Assim, um composto antioxidante, além de dever ser o mais estável possível na forma radicalar, terá uma actividade antioxidante tanto maior quanto menor for a concentração e o tempo de reacção necessários para prevenir a oxidação de um determinado substrato. Neste contexto, a extensão de descoloração definida como a redução dos radicais ABTS^{•+} e DPPH[•], foi determinada como uma função da concentração e do tempo de reacção, e calculada relativamente à reactividade do trolox (antioxidante de referência) sob as mesmas condições.

A avaliação da actividade antioxidante dos fármacos teve como base a concentração necessária de composto para reduzir, numa determinada percentagem, a concentração inicial de radical (IC). Para determinar estes valores de IC, foram traçadas regressões polinomiais de segunda ordem dos pontos experimentais obtidos (percentagem de radical *versus* concentração de composto), com uma intersecção a 100% de radical no eixo dos y ($y = ax^2 + bx + 100$), uma vez que, nem sempre se obteve uma relação linear entre a concentração de radical e a concentração do composto em estudo. A actividade antiradicalar foi, assim, definida como a

concentração de trolox ou dos fármacos anti-inflamatórios necessária para reduzir em 50% (IC_{50}) ou 25% (IC_{25}) a quantidade inicial dos radicais $ABTS^{\bullet+}$ e $DPPH^{\bullet}$, respectivamente.

A diferença de eficácia antioxidante observada para os fármacos em estudo foi avaliada pelo valor de TEAC (capacidade antioxidante equivalente ao trolox), calculado pela razão entre o $IC_{50(25)}$ do trolox e o $IC_{50(25)}$ do fármaco, para cada tempo de reacção considerado, nos ensaios efectuados com os radicais $ABTS^{\bullet+}$ e $DPPH^{\bullet}$, respectivamente.

4.2.2. Avaliação da capacidade de captação dos radicais $HO^{\bullet}$ na oxidação da 2'-dG por HPLC

O produto de oxidação da 2'-desoxiguanosina (2'-dG), a 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OH-2'-dG), tem sido frequentemente usado como marcador da oxidação do ADN por radicais livres de oxigénio [38], como os radicais hidroxilo (Figura 4.4).

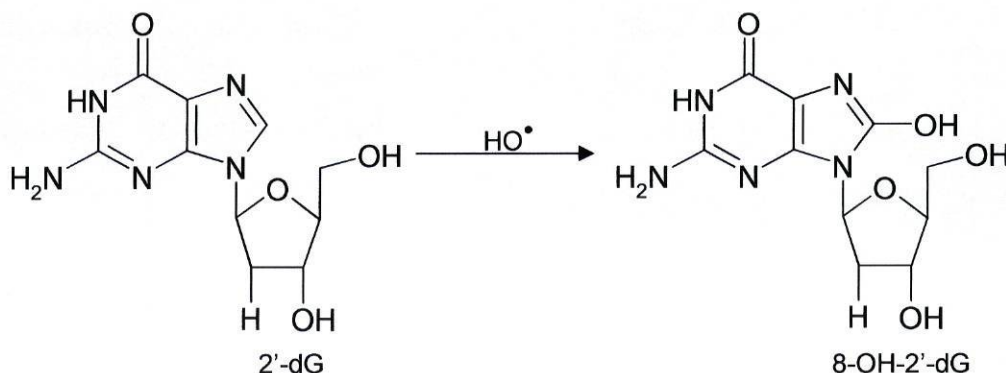
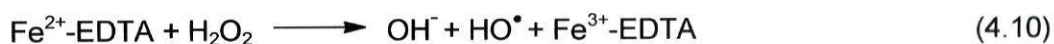


Figura 4.4: Oxidação da 2'-dG a 8-OH-2'-dG por radicais $HO^{\bullet}$.

Neste estudo utilizou-se, assim, um método que se baseia na quantificação da 8-OH-2'-dG formada a partir da 2'-dG, na presença do sistema oxidante Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 /ácido ascórbico, por HPLC. Quanto menor for a área da base oxidada presente nos cromatogramas obtidos, maior será a capacidade de protecção,

de um determinado composto, ao dano oxidativo da 2'-dG e, consequentemente, da biomolécula de ADN. Adicionalmente, este estudo permite avaliar a capacidade pró-oxidante dos compostos testados pela realização dos mesmos ensaios, mas na ausência de ácido ascórbico. A actividade pró-oxidante de um composto resultaria da sua capacidade em reduzir metais, como o Fe^{3+} , a espécies (Fe^{2+}) que poderiam reagir com o O_2 ou H_2O_2 e originar iniciadores de oxidação (equações 4.9 e 4.10).



A avaliação da actividade antioxidante e/ou pró-oxidante apresentada pelos fármacos e pelo trolox (antioxidante de referência) foi analisada pela razão das áreas obtidas para a 8-OH-2'-dG das amostras e do controlo ($8\text{-OH-2'-dG}_{\text{amostra}} / 8\text{-OH-2'-dG}_{\text{controlo}}$). Valores inferiores a 1 correspondem a uma actividade antioxidante, enquanto valores superiores à unidade indicam a existência de um efeito pró-oxidante para as concentrações usadas de composto.

4.2.3. Avaliação da capacidade de captação dos radicais $\text{ROO}^\bullet$ por fluorescência e anisotropia de fluorescência

Os estudos efectuados para avaliar a actividade antioxidante dos compostos relativamente à peroxidação lipídica induzida pelos radicais peroxilo ($\text{ROO}^\bullet$), gerados pelo AAPH ou AMVN, basearam-se na monitorização da intensidade de fluorescência e/ou da anisotropia de fluorescência de sondas fluorescentes. As sondas fluorescentes usadas foram a fluoresceína, um derivado desta, a HDAF e a DPH-PA. Estas sondas permitiram o estudo da actividade antioxidante dos compostos na fase aquosa, ao nível da superfície polar da bicamada e no interior da fase lipídica, já que apresentam lipossolubilidades distintas. Adicionalmente, foi possível avaliar a eficácia antioxidante, quando os radicais peroxilo eram gerados na fase aquosa ou na fase lipídica, respectivamente, pelo AAPH ou AMVN. Assim, o AAPH, como é hidrossolúvel, gera os radicais peroxilo na fase aquosa, enquanto que o AMVN, lipossolúvel, origina os radicais peroxilo no interior da bicamada lipídica. Este estudo permite, assim, verificar

a influência da localização dos fármacos na fase aquosa e/ou lipídica na eficácia antioxidante por eles demonstrada.

Os radicais peroxilo foram gerados por decomposição térmica do dicloridrato de 2,2'-azobis-2-amidinopropano (AAPH, Figura 4.5) ou do 2,2'-azobis (2,4-dimetilvaleronitrilo) (AMVN, Figura 4.5) a 37°C e a 45°C, respectivamente.

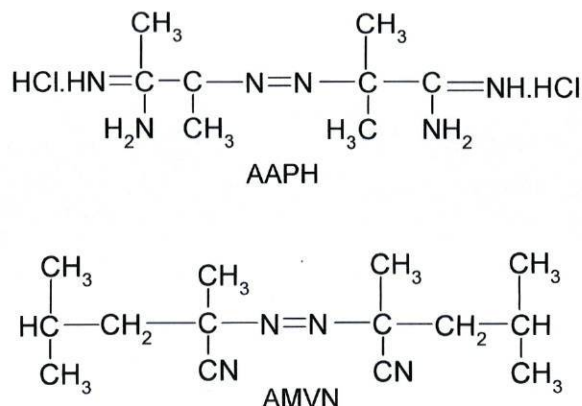


Figura 4.5: Estrutura química do AAPH e do AMVN.

Usualmente, os compostos azo são representados estruturalmente por $\text{RN}=\text{NR}$, sendo a estrutura do grupo designado por R o que os diferencia, o que determina a sua velocidade de decomposição e solubilidade na fase aquosa e lipídica, não influenciando, contudo, o mecanismo de geração dos radicais peroxilo [23]. Os compostos azo decompõem-se de acordo com a equação 4.11, originando uma molécula de azoto e dois radicais de carbono, $\text{R}^\bullet$. Alguns destes radicais de carbono formados podem recombinar-se para formar produtos estáveis (R-R), devido à proximidade existente entre eles aquando da sua formação. No entanto, a maior parte deles difunde-se separadamente e reagem rapidamente com moléculas de oxigénio, originando os radicais peroxilo (equação 4.12).



A maior ou menor eficácia antioxidante de um composto, na inibição da peroxidação lipídica induzida pelos radicais peróxido, vai depender da sua capacidade em doar um átomo de hidrogénio a esses radicais, uma vez que o mecanismo largamente aceite como o predominante para a oxidação iniciada por radicais de oxigénio, é o mecanismo em que ocorre transferência de um átomo de hidrogénio (equação 4.7) [15, 23, 24, 27, 43, 55, 56]. Deste modo, um antioxidante deverá doar o seu átomo de hidrogénio lábil ao radical $\text{ROO}^\bullet$ muito mais rapidamente do que a reacção do radical peróxido com o substrato (sonda, ácidos gordos polinsaturados). No entanto, como referido anteriormente, poderão existir mecanismos de acção dos compostos alternativos relativamente à peroxidação lipídica, que não envolvem a captura dos radicais oxidantes, mas nos quais há uma alteração das propriedades da membrana, pelos fármacos em questão, que impede a propagação da oxidação. De facto, estes mecanismos de acção alternativos podem complementar ou serem mesmo os responsáveis pela actividade antioxidante demonstrada por um determinado composto.

A avaliação da actividade antioxidante dos AINEs, na captação do radical $\text{ROO}^\bullet$, foi monitorizada pelo decréscimo da intensidade de fluorescência das sondas fluorescentes referidas, que resulta da própria oxidação das sondas, e pela avaliação da alteração da fluidez membranar por estudos de anisotropia de fluorescência (na presença da sonda DPH-PA incorporada em lipossomas de EPC e do composto azo AAPH).

Os dados da intensidade de fluorescência (ou de anisotropia de fluorescência) obtidos foram convertidos em valores relativos pela divisão do valor da intensidade de fluorescência (ou de anisotropia de fluorescência) a um determinado tempo pelo valor da intensidade de fluorescência (ou de anisotropia de fluorescência) no tempo correspondente a 0 min. Posteriormente, foi determinada a área sob a curva (AUC) da representação gráfica correspondente à fluorescência relativa (ou da anisotropia relativa) *versus* tempo.

Os resultados obtidos para a avaliação da actividade antioxidante dos AINEs, foram analisados pela razão da diferença das áreas sob a curva obtidas com os compostos em estudo e com o controlo de peroxidação (sem fármaco/antioxidante de referência) pela área sob a curva obtida com o controlo de peroxidação: $(\text{AUC}_{\text{AINE/Antioxidante de referência}} - \text{AUC}_{\text{AAPH/AMVN}}) / \text{AUC}_{\text{AAPH/AMVN}}$ (para os estudos de anisotropia de fluorescência o numerador da divisão é invertido, para evitar a obtenção de valores

negativos). Assim, valores superiores à unidade representam um efeito antioxidante pelo composto em estudo.

A avaliação da actividade antioxidante dos AINEs com base no cálculo da área sob a curva da representação gráfica fluorescência relativa (ou anisotropia relativa) *versus* tempo constitui uma técnica que permite combinar num único valor, o tempo e o grau de inibição da oxidação de uma sonda por um determinado radical, obtido na presença de um composto com propriedades antioxidantes [57, 58].

4.2.4. Avaliação da capacidade de captação dos radicais HO[•] por fluorescência

O presente trabalho estudou os efeitos antioxidantes que os compostos apresentam relativamente à peroxidação lipídica induzida pelos radicais hidroxilo gerados na fase aquosa pelo sistema Fe²⁺/H₂O₂. Os radicais HO[•] foram gerados, pelo sistema Fe²⁺/H₂O₂, segundo a reacção de Fenton descrita anteriormente (equação 4.10). O sistema de oxidação referido permitiu a formação de radicais HO[•] na ausência de um agente redutor (como por exemplo, o ácido ascórbico) [3, 39], o que constitui uma vantagem, pois a adição desse agente redutor ao meio reaccional poderia inibir as reacções de propagação da peroxidação lipídica.

A sonda DPH-PA foi a sonda utilizada para avaliar a eficácia antioxidante dos fármacos face aos radicais hidroxilo. Assim, neste ensaio, monitorizou-se a peroxidação lipídica pelo decréscimo da intensidade de fluorescência da sonda DPH-PA, que resultava da sua própria oxidação.

Os radicais HO[•], assim como os radicais ROO[•], sendo espécies reactivas de oxigénio iniciam a peroxidação lipídica através da remoção de um átomo de hidrogénio a moléculas susceptíveis (mecanismo de transferência de um átomo de hidrogénio), embora com uma menor eficácia do que os radicais ROO[•], como referido anteriormente. Neste contexto, um composto com elevada eficácia antioxidante face aos radicais peroxilo também a deverá apresentar contra os radicais hidroxilo, uma vez que o mecanismo de acção será basicamente o mesmo.

O método de cálculo utilizado para a determinação da actividade antioxidante observada para os diferentes compostos em estudo foi exactamente igual ao descrito para o estudo efectuado com os indicadores da peroxidação lipídica AAPH e AMVN.

4.3. PARTE EXPERIMENTAL

4.3.1. Reagentes

Além dos reagentes mencionados no capítulo 2, foram ainda utilizados, para a realização destes estudos, os reagentes descritos em seguida. O ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), o dihidrogénio fosfato de potássio (KH_2PO_4), o ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), o 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH), o persulfato de potássio ($\text{K}_2\text{O}_8\text{S}_2$), a fluoresceína, a 5-hexadecanoilaminofluoresceína (HDAF), o galhato de laurilo, a 2'-desoxiguanosina (2'-dG) e a 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OH-2'-dG) foram adquiridos à Sigma-Aldrich. O 2-carboxi-2,5,7,8-tetrametil-6-cromanol (Trolox) e o dicloridrato de 2,2'-azobis-2-amidinopropano (AAPH) foram adquiridos à Fluka. O 2,2'-azobis(2,4-dimetilvaleronitrilo) (AMVN) foi gentilmente cedido pela Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. O sulfato de ferro (II) e amónio hexahidratado [$(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$] foi adquirido à Riedel-deHaën. O ácido 3-(p-(6-fenil)-1,3,5-hexatrienilfenil)propiónico (sonda DPH-PA) foi adquirido à Molecular Probes. Os restantes reagentes, de qualidade p. a., foram adquiridos à Merck. Todos os reagentes citados foram usados sem qualquer purificação adicional.

4.3.2. Avaliação da actividade antioxidante dos AINEs face aos radicais $\text{ABTS}^{\bullet+}$ e $\text{DPPH}^{\bullet}$

A actividade antioxidante dos AINEs foi determinada espectrofotometricamente, usando $\text{ABTS}^{\bullet+}$ e $\text{DPPH}^{\bullet}$ como radicais livres [46, 49, 54, 59].

Preparação da solução de $\text{ABTS}^{\bullet+}$: o radical monocatião $\text{ABTS}^{\bullet+}$ foi gerado pela reacção do ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS; 7 mM) com o agente oxidante persulfato de potássio (2,45 mM) em solução aquosa. A mistura foi depois deixada à temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 12 - 16 horas, para que a oxidação do ABTS fosse a mais completa possível e, deste modo, se obtivesse uma absorvância elevada e constante.

O cromóforo verde azulado $\text{ABTS}^{\bullet+}$, uma vez formado, é estável por um período superior a dois dias, quando guardado no escuro à temperatura ambiente, e

apresenta uma banda de absorção máxima nos comprimentos de onda 645 nm, 734 nm e 815 nm.

Preparação da solução de DPPH[•]: para a obtenção do radical DPPH[•] preparou-se uma solução etanólica de 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH; 1,9 mM) de cor violeta escuro.

Antes da realização dos ensaios, as concentrações das soluções dos radicais ABTS^{•+} e DPPH[•] foram ajustadas com etanol, de modo a que 180 µL de cada solução tivesse uma absorvância de $0,45 \pm 0,01$ a 734 nm a 30°C e de $0,38 \pm 0,01$ a 515 nm a 25°C, respectivamente, no leitor de placas referido em seguida. Este controlo da absorvância permitia que a concentração inicial dos radicais livres, nos diferentes ensaios, fosse sensivelmente a mesma.

Para cada um dos AINES em estudo e para o trolox, usado como antioxidante de referência, foram testadas concentrações compreendidas entre 1,5 e 15 µM. As absorvâncias das amostras, constituídas por alíquotas de 20 µL de soluções etanólicas de AINES ou de trolox e 180 µL de solução de radical, foram medidas a cada 5 min durante 20 min a 30°C no estudo com o radical ABTS^{•+}, enquanto que para o radical DPPH[•] a absorvância foi medida, a 25°C, a cada min durante os primeiros 10 min e depois a cada 5 min durante os restantes 50 min. Um ensaio controlo (20 µL etanol + 180 µL de radical) foi efectuado paralelamente a cada medição.

Todas as determinações de absorvância foram feitas em quadruplicado num leitor multiplacas Bio-Tek Synergy HT com temperatura controlada a 30°C e 25°C para os radicais ABTS^{•+} e DPPH[•], respectivamente.

4.3.3. Avaliação da actividade antioxidante dos AINES face à oxidação da 2'-desoxiguanosina

O estudo da actividade antioxidante/pró-oxidante dos AINES na oxidação, por radicais hidroxilo, da 2'-desoxiguanosina a 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina, foi efectuado usando um método adaptado a partir do descrito por Yen e colaboradores [60, 61].

A reacção da mistura, constituída por alíquotas das soluções de AINES (de 0 a 960 µM para o etodolac; de 0 a 930 µM para o tenoxicam; de 0 a 350 µM para o piroxicam; de 0 a 1000 µM para o diclofenac; de 0 a 374 µM para a clonixina; e de 0 a 678 µM para o indoprofeno) ou trolox (de 0 a 1000 µM), 2'-dG (1 mM), tampão fosfato

de potássio (20 mM, pH 7,4), foi iniciada pela adição do sistema oxidante constituído por H_2O_2 (50 mM), FeCl_3 (1,3 mM) e EDTA (6,5 mM), na presença ou na ausência de ácido ascórbico (15 mM). Como as várias soluções dos fármacos e trolox (antioxidante de referência) foram preparadas com tampão fosfato de potássio suplementado com 10% de acetonitrilo (CH_3CN), o meio reaccional também continha 2% deste solvente. As amostras (1,5 mL), assim preparadas, foram incubadas a 37°C durante 45 min. Para terminar o processo de oxidação, foi adicionado etanol (20 μL) à mistura reaccional e as amostras foram mantidas em gelo até se proceder à sua análise. O branco foi preparado da mesma forma que as amostras, mas não possuía na sua constituição trolox ou AINES.

O produto de oxidação, 8-OH-2'-dG, foi separado e detectado a 254 nm, por HPLC. A análise de 20 μL de amostra injectada foi conduzida à temperatura ambiente num cromatógrafo Merck/Hitachi – LaChrom da série 7000 equipado com um detector DAD (L-7455), uma bomba (L-7100) e uma coluna Waters Spherisorb ODS2 (4,6 x 250 mm, 5 μm) com uma pré-coluna. A fase móvel usada era composta por 85% de dihidrogénio fosfato de potássio (KH_2PO_4 , 50 mM) e 15% de metanol a um fluxo de 1 mL/min. Todas as amostras foram analisadas em triplicado.

Os compostos foram identificados por comparação dos seus tempos de retenção com os dos respectivos padrões. A 2'-dG e a 8-OH-2'-dG apresentam factores de retenção de 1,77 e 2,50, respectivamente. Adicionalmente, a determinação quantitativa do produto de oxidação foi feita com base na área dos picos presentes nos cromatogramas.

4.3.4. Avaliação da actividade antioxidante dos AINES face aos radicais $\text{ROO}^\bullet$ gerados na fase aquosa e lipídica

Os tampões utilizados na realização dos diferentes ensaios para a avaliação da actividade antioxidante dos AINES face aos radicais peroxilo, gerados pelo AAPH ou pelo AMVN, diferiram de acordo com a sonda fluorescente utilizada. Assim, os métodos que monitorizavam a oxidação pelo decréscimo da intensidade de fluorescência das sondas fluoresceína e HDAF foram realizados em tampão fosfato (75 mM, $I = 0,1$ M, pH 7,4), uma vez que o tampão hepes (10 mM, $I = 0,1$ M, pH 7,4) interferia nos resultados obtidos. Na Figura 4.6 é possível observar a diferença nos resultados obtida com as sondas fluoresceína (A) e HDAF (B), quando os ensaios

eram realizados simultaneamente nas mesmas condições, variando apenas o tampão utilizado (tampão hepes ou tampão fosfato). A utilização do tampão hepes, além de não permitir a obtenção de resultados reprodutíveis, parecia impedir a oxidação das sondas referidas, uma vez que a intensidade de fluorescência das sondas sofria um decréscimo menor do que o observado quando os ensaios eram realizados em tampão fosfato, ao longo de todo o tempo de reacção.

No ensaio de avaliação da actividade antioxidante dos AINEs na peroxidação lipídica induzida pelo AAPH ou pelo AMVN, por estudos de fluorescência (e anisotropia de fluorescência) com a sonda DPH-PA, o tampão utilizado foi o tampão hepes, uma vez que a interferência referida anteriormente não se verificava neste estudo.

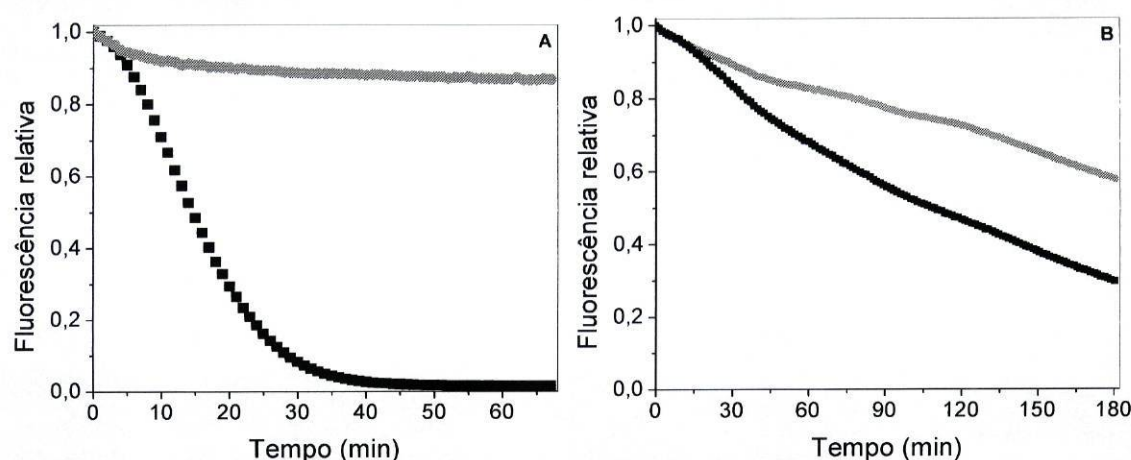


Figura 4.6: Fluorescência relativa obtida nos ensaios com as sondas fluoresceína (A) e HDAF (B) realizados simultaneamente em tampão hepes (10 mM; $I = 0,1$ M; pH 7,4; (●)) e tampão fosfato (75 mM, $I = 0,1$ M; pH 7,4; (■)), na presença do iniciador de oxidação AAPH (15 e 66 mM para o ensaio com a fluoresceína e com a HDAF, respectivamente), a 37°C.

Para cada um dos estudos, efectuados com as diferentes sondas fluorescentes e iniciadores da peroxidação lipídica, foram realizados três tipos de ensaios controlo:

- 1) Um ensaio controlo para as sondas, que visava verificar se a oxidação das sondas fluoresceína, HDAF e DPH-PA ocorria nas condições do ensaio, sem a adição dos compostos em estudo ou do indutor de peroxidação (AAPH ou AMVN). Deste modo, este controlo era apenas constituído pela sonda dissolvida no tampão apropriado ou incorporada nos LUVs.
- 2) Um ensaio controlo propriamente dito, que tinha como objectivo verificar se os fármacos em estudo ou os antioxidantes de referência usados tinham capacidade de

provocar uma diminuição da intensidade de fluorescência das sondas, ou seja, se apresentavam actividade pró-oxidante. Este ensaio continha, no tampão apropriado, a concentração máxima do composto a testar e a sonda dissolvida na solução aquosa ou incorporada nos LUVs.

3) É um ensaio controlo da peroxidação ou branco, que servia de comparação aos ensaios em que o fármaco era adicionado ao meio reaccional, uma vez que neste tipo de controlo havia uma oxidação o mais completa possível da sonda em estudo. Apresentava na sua constituição a sonda e o indutor da oxidação (AAPH ou AMVN), ou seja, este controlo era preparado da mesma forma que as amostras, mas sem a adição do fármaco ou do antioxidante de referência em estudo.

Assim como nos ensaios anteriores, para uma melhor avaliação da capacidade antioxidante dos fármacos, realizaram-se estes estudos na presença de compostos com actividades antioxidante reconhecidas, nomeadamente o trolox, a vitamina E e/ou o galhato de laurilo.

4.3.4.1. Radicais ROO[•] gerados na fase aquosa

Para a realização do estudo da actividade antioxidante dos AINEs na presença do iniciador de oxidação AAPH, pelas diferentes sondas, foi necessária a preparação de lipossomas de EPC. Os ensaios realizados com a sonda fluoresceína em tampão fosfato foram efectuados na presença e na ausência de lipossomas.

Os lipossomas unilamelares foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico descrito no capítulo 2. No entanto, nos estudos realizados para a avaliação da actividade antioxidante dos AINEs face à peroxidação lipídica usando as sondas HDAF e DPH-PA, antes de se proceder à evaporação dos solventes orgânicos, era adicionada a sonda HDAF dissolvida em etanol ou a sonda DPH-PA dissolvida em clorofórmio/metanol (3:2, V/V). Nos ensaios efectuados com a vitamina E, também se adicionava este antioxidante de referência dissolvido em metanol, em diferentes concentrações, à solução de EPC, antes de se preparar o filme lipídico. De seguida, preparava-se, então, como já descrito anteriormente, o filme lipídico e os lipossomas unilamelares.

As concentrações de EPC e HDAF na suspensão de LUVs obtida eram de 3 mM e 0,5 μ M, respectivamente, enquanto a concentração de DPH-PA incorporada nos LUVs (1,5 mM) era igual a 5 μ M. A razão lípido:sonda foi sempre igual ou superior a

6000:1 e 300:1 para as sondas HDAF e DPH-PA, respectivamente, de modo a prevenir possíveis modificações na estrutura da membrana lipídica.

A solução de AAPH era preparada diariamente e imediatamente antes da realização dos ensaios, por dissolução da massa necessária do iniciador de peroxidação no tampão apropriado.

O decréscimo da intensidade de fluorescência da sonda fluoresceína, na ausência e na presença de LUVs, e da sonda HDAF foi monitorizado num leitor multiplacas Bio-Tek Synergy HT, com temperatura controlada a 37°C. O comprimento de onda de excitação utilizado foi de 485 ± 20 nm e o comprimento de onda de emissão de 528 ± 20 nm e 521 ± 20 nm para as sondas fluoresceína e HDAF, repectivamente. O equipamento usado para medir a intensidade de fluorescência da sonda DPH-PA e o aumento da anisotropia de fluorescência foi um espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS 50B equipado com compartimento de célula termostatizado (37°C). O comprimento de onda de excitação utilizado foi de 384 nm, o comprimento de onda de emissão de 435 nm e o tempo de integração igual a 10 s.

Em seguida, descrevem-se as condições específicas necessárias para a realização dos estudos na presença das diferentes sondas.

4.3.4.1.1. Avaliação da actividade antioxidante dos AINEs usando a sonda fluoresceína

A avaliação da capacidade de captação do radical $\text{ROO}^{\bullet}$ pelos fármacos em estudo foi realizada por fluorimetria, monitorizando-se a oxidação da sonda fluoresceína pelo radical peróxido de acordo com o descrito por Fernandes *et al* [42], na ausência e na presença de LUVs de EPC.

Nos ensaios efectuados em tampão fosfato, a mistura reaccional continha, num volume final de 200 μL , os reagentes dissolvidos em tampão fosfato (75 mM, $I = 0,1$ M, pH 7,4), nas seguintes concentrações finais: 48 nM de fluoresceína, 0 a 20 μM de AINE ou trolox e 15 mM de AAPH. O AAPH era o último reagente a ser introduzido na mistura reaccional e só após um período de incubação de 10 min, com agitação, a 37°C.

As determinações foram efectuadas em quadruplicado num mesmo ensaio e monitorizadas durante 180 min.

Nos ensaios efectuados em presença de lipossomas unilamelares de EPC em tampão fosfato, os diferentes reagentes foram adicionados pela seguinte ordem: 80 μL da suspensão de LUVs, 150 μL da solução de composto a testar, 30 μL de fluoresceína e 40 μL de AAPH. As concentrações presentes na mistura reaccional, com um volume final de 300 μL , eram iguais a: 800 μM de LUVs, 48 nM de fluoresceína, 0 a 15 μM de AINE ou antioxidante de referência e 25 mM de AAPH. Tal como no ensaio anterior, antes da adição do iniciador de oxidação, a mistura constituída por LUVs/fluoresceína/AINEs ou trolox era agitada durante 10 min, a 37°C, no equipamento de medida.

Neste estudo, como no anterior, a intensidade de fluorescência foi monitorizada durante 180 min e todas as determinações foram feitas em quadruplicado num mesmo ensaio.

4.3.4.1.2. Avaliação da actividade antioxidante dos AINEs usando a sonda HDAF

Neste estudo, a actividade antioxidante dos AINEs na captação do radical $\text{ROO}^\bullet$ foi monitorizada pelo decréscimo da intensidade de fluorescência da sonda HDAF incorporada em lipossomas.

Para a realização deste ensaio, adicionou-se a 80 μL da suspensão de LUVs contendo a sonda fluorescente HDAF, 110 μL das soluções de fármaco ou trolox em tampão fosfato (75 mM, $I = 0,1$ M, pH 7,4), e só após um período de incubação de 10 min com agitação, a 37°C, é que se adicionou 110 μL de AAPH para iniciar a oxidação. As concentrações finais de cada um dos reagentes, na mistura reaccional de volume igual a 300 μL , foram as seguintes: 800 μM de EPC, 0,13 μM de HDAF, 0 a 293 μM de etodolac e indoprofeno, 0 a 147 μM de tenoxicam, 0 a 206 μM de piroxicam, 0 a 363 μM de clonixina, 0 a 183 μM de trolox e 200 mM de AAPH.

O decréscimo da intensidade de fluorescência da sonda HDAF foi monitorizado durante 360 min e todas as determinações foram feitas em duplicado, num mesmo ensaio.

4.3.4.1.3. Avaliação da actividade antioxidante dos AINES usando a sonda DPH-PA

O estudo da actividade antioxidante dos AINES na peroxidação lipídica, avaliada pelo decréscimo da intensidade de fluorescência da sonda DPH-PA, foi efectuado de acordo com o método descrito por Arora *et al* [24]. No entanto, como tem sido sugerido que a actividade antioxidante demonstrada por um composto, pode ser não só devida à captura dos radicais livres, mas também devida a alterações na fluidez das membranas, procedeu-se também ao estudo do efeito dos AINES na fluidez da membrana durante a peroxidação lipídica. Este ensaio complementou, assim, o método descrito por Arora *et al* [24], uma vez que não se monitorizou apenas o decréscimo da intensidade de fluorescência da sonda DPH-PA, mas também a fluidez membranar por estudos de anisotropia de fluorescência.

Para a avaliação da peroxidação lipídica, adicionou-se a 1,0 mL da suspensão de LUVs com a sonda DPH-PA incorporada, diferentes concentrações de AINES ou trolox, numa célula de fluorimetria. Nos estudos efectuados com o antioxidante de referência vitamina E, o volume correspondente à solução dos compostos a testar era substituído por tampão hepes, uma vez que este antioxidante de referência já se encontrava incorporado nos lipossomas. Após um período de incubação de 10 min com agitação, a 37°C, iniciou-se a peroxidação lipídica pela adição do AAPH. As concentrações finais de cada um dos reagentes referidos foram: 800 µM de LUVs, 2,7 µM de DPH-PA, 0 a 125 µM de tenoxicam, 0 a 120 µM de piroxicam, 0 a 170 µM de etodolac, 0 a 144 µM de indoprofeno, 0 a 222 µM de clonixina, 0 a 18 µM de trolox, 0 a 15 µM de vitamina E e 15 mM de AAPH.

O decréscimo da intensidade de fluorescência da sonda DPH-PA e o aumento da anisotropia de fluorescência foram monitorizados durante 60 min, no espectrofluorímetro anteriormente referido.

4.3.4.2. Radicais $ROO^{\bullet}$ gerados na fase lipídica

Os lipossomas, necessários para a avaliação antioxidante dos AINES face à peroxidação lipídica iniciada pelo AMVN na presença das sondas fluoresceína, HDAF ou DPH-PA, foram preparados de acordo com o método descrito no estudo com o iniciador AAPH. Contudo, antes de se proceder à evaporação dos solventes, era

também adicionado, à solução orgânica, o iniciador lipossolúvel AMVN, dissolvido em clorofórmio, na concentração adequada. Uma vez que o agente oxidante era susceptível a decomposição térmica, houve necessidade de controlar a temperatura, durante e após todo o processo de preparação dos LUVs. Assim, a temperatura de extrusão, como todo o manuseamento, procedeu-se a uma temperatura inferior ou igual a 25°C. Um outro parâmetro importante a ter em conta foi a necessidade de, após a hidratação do filme lipídico com tampão fosfato ou tampão hepes, utilizar um banho de ultrassons para adjuvar a agitação em vórtice na formação dos MLVs. A dupla utilização, por um curto período de tempo (num total de 20 s), do banho de ultrassons foi requerida, pois a agitação forte em vórtice não se mostrava suficiente para remover todo o filme que se encontrava aderido às paredes do balão.

O equipamento de medida utilizado, para medir a intensidade de fluorescência das sondas DPH-PA, fluoresceína e HDAF, foi um espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS 50B equipado com compartimento de célula termostaticado a 45°C. Os comprimentos de onda de excitação e de emissão utilizados foram os mesmos descritos anteriormente (4.3.4.1).

4.3.4.2.1. Avaliação da actividade antioxidante dos AINEs usando a sonda DPH-PA

O estudo da actividade antioxidante dos AINEs na peroxidação lipídica, induzida pelo AMVN e avaliada pelo decréscimo da intensidade de fluorescência da sonda DPH-PA, foi efectuado usando um método optimizado a partir do que se encontrava descrito na literatura para a determinação da actividade antioxidante dos compostos face aos radicais peróxilo gerados por este iniciador lipossolúvel [17, 23, 31, 40].

Para a avaliação da peroxidação lipídica, adicionou-se a 1,0 mL da suspensão de LUVs com a sonda DPH-PA e o iniciador AMVN incorporados, diferentes concentrações de AINEs, trolox ou galhato de laurilo (dissolvido em etanol e adicionado numa proporção que não ultrapassasse os 2% em etanol no meio reaccional). Nos estudos com a vitamina E, o volume correspondente à solução dos compostos a testar era substituído por tampão hepes, uma vez que este antioxidante de referência, também já se encontrava incorporado nos lipossomas. A mistura reaccional, assim preparada, era agitada e incubada durante 10 min, a um valor de

temperatura inferior ou igual a 25°C, ao abrigo da luz. Após o período de incubação, a amostra era exposta a uma temperatura de 45°C e, conseqüentemente, a peroxidação lipídica era iniciada. As concentrações finais de cada um dos reagentes referidos foram: 800 μM de LUVs, 2,7 μM de DPH-PA, 300 μM de AMVN, 0 a 222 μM de tenoxicam, 0 a 210 μM de piroxicam, 0 a 355 μM de etodolac, 0 a 356 μM de indoprofeno, 0 a 444 μM de clonixina, diclofenac e vitamina E, 0 a 444 μM de trolox e 0 a 112 μM de galhato de laurilo.

A intensidade de fluorescência foi monitorizada durante 20 min, no espectrofluorímetro utilizado para a realização deste estudo.

4.3.4.2.2. Avaliação da actividade antioxidante dos AINES usando a sonda fluoresceína

Este estudo efectuou-se após a adição dos diferentes reagentes, na célula de fluorimetria, pela seguinte ordem: 1,0 mL da suspensão de LUVs, 50 μL de fluoresceína e 750 μL de tampão fosfato. As concentrações presentes na mistura reaccional eram: 800 μM de LUVs, 500 ou 1500 μM de AMVN e 48 nM de fluoresceína. Após um período de incubação de 10 min, ao abrigo da luz e a uma temperatura inferior ou igual a 25°C, iniciava-se a peroxidação lipídica a 45°C.

A intensidade de fluorescência da sonda fluoresceína foi monitorizada, durante 60 min, no equipamento de medida.

4.3.4.2.3. Avaliação da actividade antioxidante dos AINES usando a sonda HDAF

Para a realização destes ensaios, adicionou-se a 1,0 mL da suspensão de LUVs contendo na sua constituição a sonda fluorescente HDAF e o iniciador AMVN, 800 μL de tampão fosfato, e, após agitação, iniciou-se a peroxidação lipídica a 45°C. As concentrações finais, na mistura reaccional, eram as seguintes: 800 μM de EPC, 0,13 μM de HDAF e 500 ou 1500 μM de AMVN.

A monitorização da intensidade de fluorescência foi efectuada durante 60 min no espectrofluorímetro referido anteriormente.

4.3.5. Avaliação da actividade antioxidante dos AINES face aos radicais HO[•]

A avaliação da actividade antioxidante dos AINES na peroxidação lipídica induzida pelo radical HO[•], gerado pelo sistema Fe²⁺/H₂O₂, foi efectuada pela monitorização da oxidação da sonda DPH-PA através de uma metodologia com detecção fluorimétrica, de acordo com o método descrito por Gutiérrez *et al* [30].

A parte experimental desta metodologia foi, em tudo, semelhante à do estudo com o iniciador da peroxidação AAPH na presença da sonda DPH-PA, excepto a indução da peroxidação lipídica. Assim, após o período de incubação de 10 min dos LUVs com os AINES ou trolox, iniciou-se a peroxidação lipídica pela adição de 200 µL da solução de Fe²⁺-EDTA, seguida da adição de 200 µL da solução de H₂O₂.

A solução de Fe²⁺-EDTA foi preparada a partir da dissolução do (NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O em tampão hepes com EDTA (1:5 Fe²⁺/EDTA) e a solução de H₂O₂ foi preparada por diluição de uma solução 30% em H₂O₂ em tampão hepes. As soluções referidas eram preparadas diariamente.

A mistura reaccional, continha, num volume final de 1800 µL, os seguintes constituintes nas concentrações finais indicadas: 800 µM de LUVs, 2,7 µM de DPH-PA, 0 a 113 µM de tenoxicam, 0 a 99 µM de piroxicam, 0 a 189 µM de indoprofeno, 0 a 222 µM de etodolac, 0 a 222 µM de clonixina e diclofenac, 0 a 18 µM de trolox, 0,4 mM de Fe²⁺ e 4 mM de H₂O₂.

A peroxidação lipídica foi monitorizada durante 30 min, a 37°C, no mesmo espectrofluorímetro e nos comprimentos de onda de excitação e de emissão referidos na parte experimental de avaliação da actividade antioxidante dos AINES pela sonda DPH-PA na peroxidação lipídica induzida pelo AAPH.

4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1. Avaliação da actividade antioxidante dos AINES face aos radicais ABTS^{•+} e DPPH[•]

A diminuição da absorvância passível de ocorrer está directamente relacionada com a diminuição da concentração do radical na solução e, consequentemente, indica que o composto em estudo apresenta propriedades antiradicalares.

As representações gráficas das concentrações dos radicais $\text{ABTS}^{\bullet+}$ e $\text{DPPH}^{\bullet}$ em função das concentrações dos AINES em estudo e do trolox, após 5, 10, 15 e 20 min de tempo de reacção para o radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ e 5, 15 e 60 min de tempo de reacção para o radical $\text{DPPH}^{\bullet}$ podem ser observadas nas Figuras 4.7 a 4.10.

Pela observação da Figura 4.7, é possível concluir que os AINES clonixina e indoprofeno não apresentaram actividade antioxidante relativamente ao radical monocatión $\text{ABTS}^{\bullet+}$, uma vez que a concentração deste permanece próxima de 100% ao longo de todo o tempo de reacção e qualquer que seja a concentração de fármaco usada. Por outro lado, o diclofenac, o etodolac, o tenoxicam e o piroxicam demonstraram possuir actividade antioxidante, pois foram capazes de provocar uma diminuição da absorvância. Estes fármacos, com excepção do diclofenac, atingem o máximo da sua capacidade antioxidante face ao radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ao fim de 5 min.

Nas Figuras 4.8 e 4.9 apresentam-se os resultados obtidos para o antioxidante de referência face aos radicais $\text{ABTS}^{\bullet+}$ e $\text{DPPH}^{\bullet}$, respectivamente. É possível observar que o trolox possui actividade antioxidante relativamente aos dois radicais livres considerados e que no ensaio realizado com o radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ atinge a sua máxima eficácia antioxidante após 5 min de tempo de reacção.

A Figura 4.10, obtida após a realização do ensaio com o radical $\text{DPPH}^{\bullet}$, mostra que, dos AINES estudados, apenas o piroxicam e o tenoxicam mostraram capacidade antioxidante, mas numa menor extensão e num período de tempo de reacção superior aos observados no método para o radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (Figura 4.7). Neste estudo, é possível verificar que a reacção é tanto mais completa quanto maior for o tempo de reacção, mesmo para o antioxidante de referência (Figura 4.9). De facto, alguns compostos reagem rapidamente com o radical $\text{DPPH}^{\bullet}$, mas para a maioria dos compostos existentes na literatura, as reacções são lentas, sendo o tempo de ensaio considerado um importante parâmetro na avaliação da actividade antioxidante de um composto por esta metodologia [54].

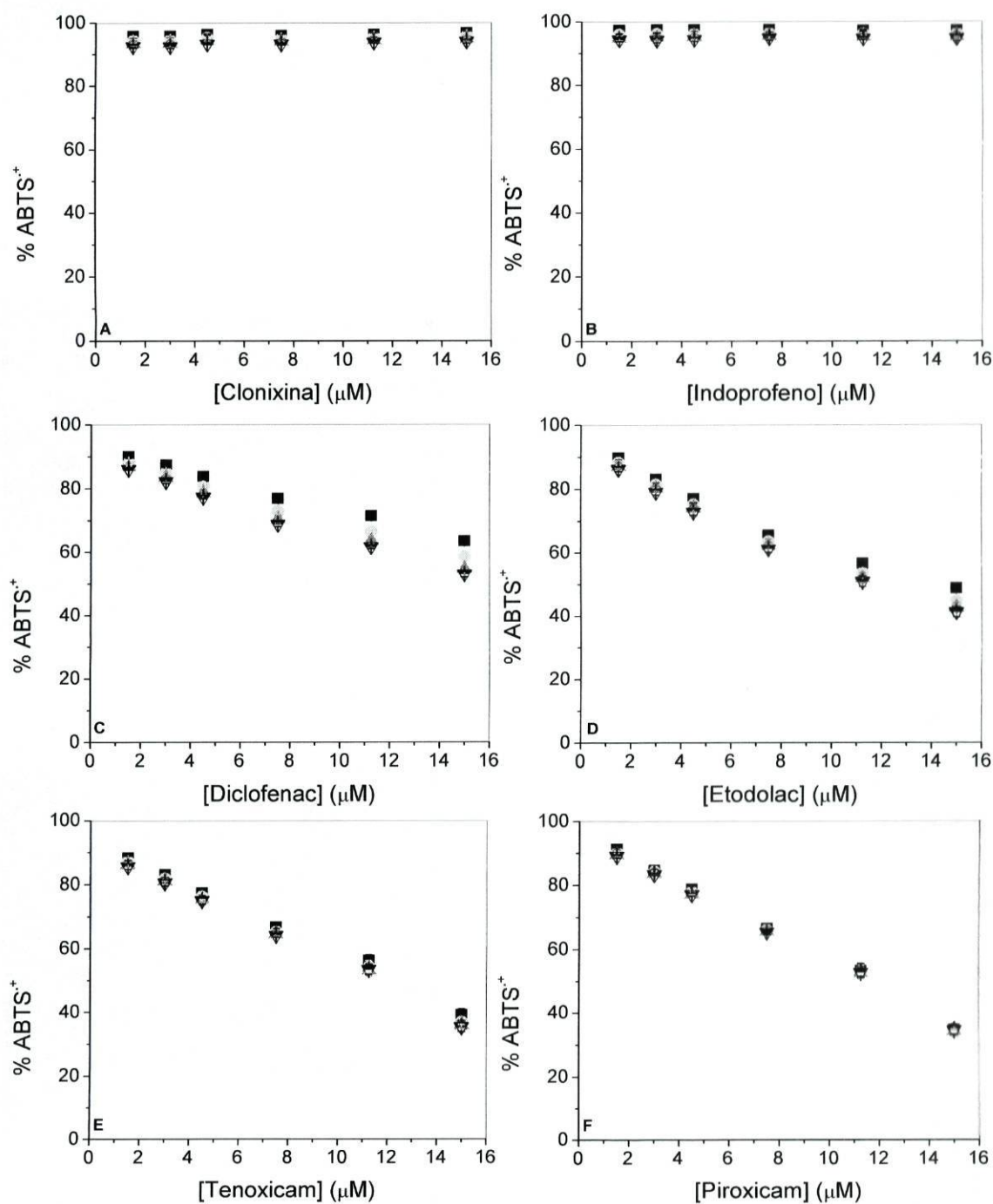


Figura 4.7: Percentagem do radical monocatão $\text{ABTS}^{\bullet+}$, com o respectivo desvio padrão, na presença de concentrações crescentes de clonixina (A), indoprofeno (B), diclofenac (C), etodolac (D), tenoxicam (E) e piroxicam (F), a diferentes tempos de reacção: (■) 5 min, (○) 10 min, (▲) 15 min e (▼) 20 min.

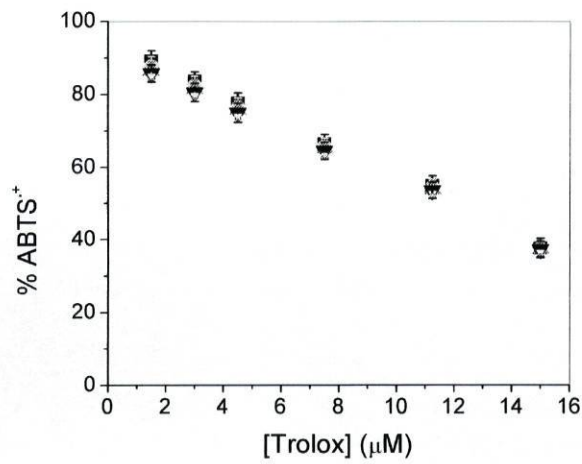


Figura 4.8: Percentagem do radical monocatão $\text{ABTS}^{\bullet+}$, com o respectivo desvio padrão, na presença de concentrações crescentes de trolox, a diferentes tempos de reacção: (■) 5 min, (●) 10 min, (▲) 15 min e (▼) 20 min.

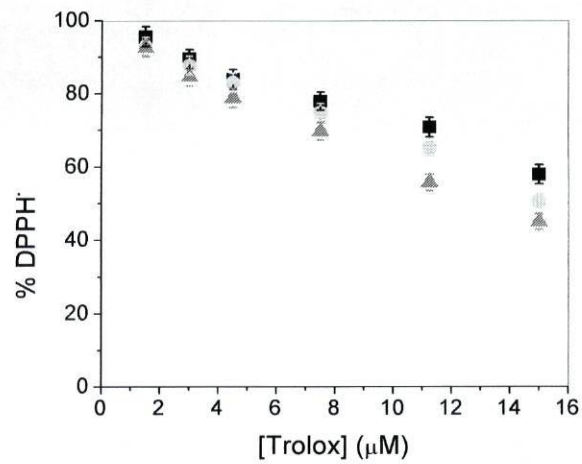


Figura 4.9: Percentagem do radical $\text{DPPH}^{\bullet}$, com o respectivo desvio padrão, na presença de concentrações crescentes de trolox, a diferentes tempos de reacção: (■) 5 min, (●) 15 min e (▲) 60 min.

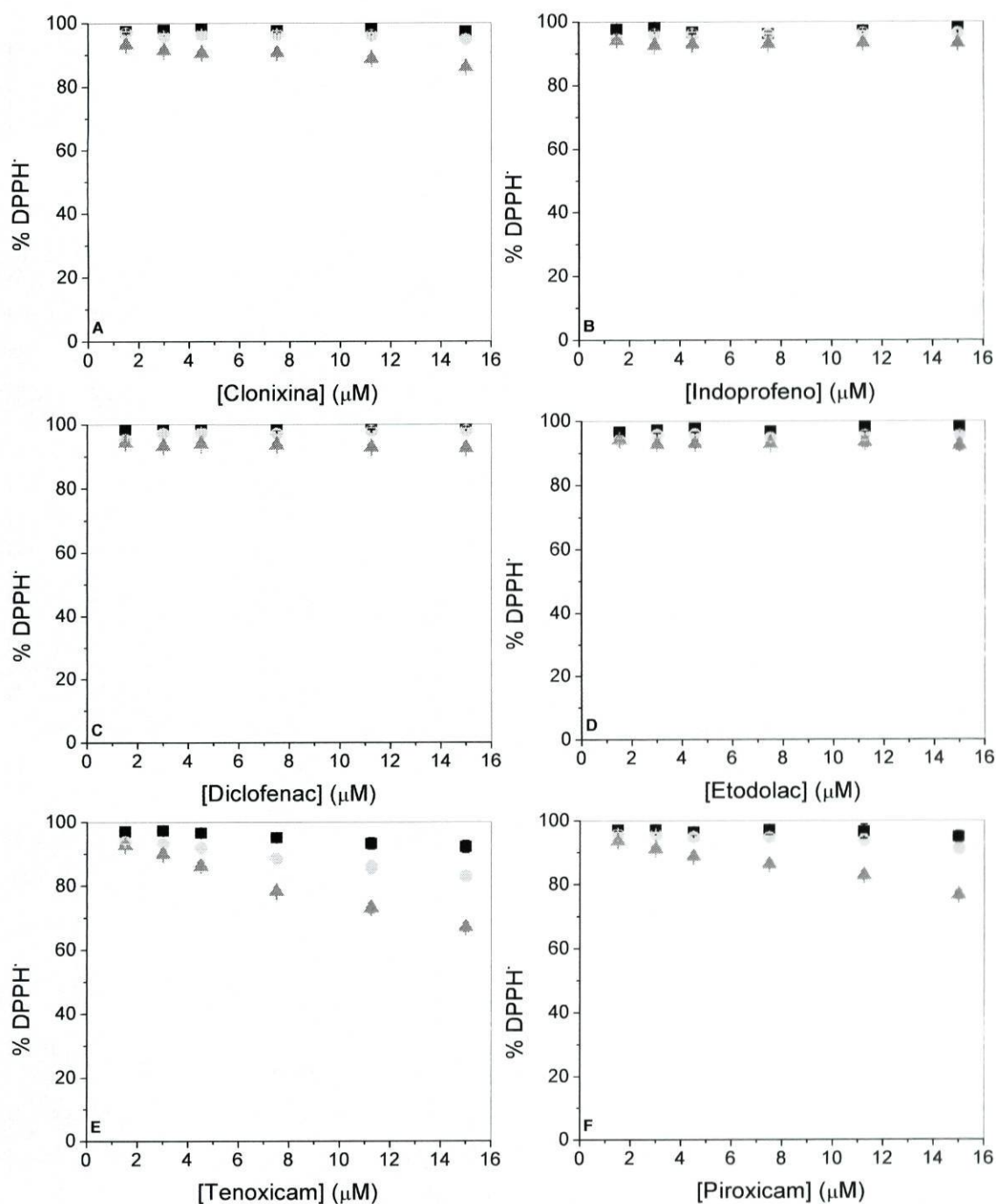


Figura 4.10: Percentagem do radical DPPH•, com o respectivo desvio padrão, na presença de concentrações crescentes de clonixina (A), indoprofeno (B), diclofenac (C), etodolac (D), tenoxicam (E) e piroxicam (F), a diferentes tempos de reacção: (■) 5 min, (●) 15 min e (▲) 60 min.

A capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC) foi usada para estabelecer a hierarquia da eficácia antioxidante dos AINEs face aos radicais em estudo. Assim, com base nos valores de TEAC, ou seja, dos cocientes do $IC_{50(25)}$ do

trolox pelo $IC_{50(25)}$ do fármaco obtidos, respectivamente, nos ensaios de descoloração do radical $ABTS^{\bullet+}$ e $DPPH^{\bullet}$, foi possível verificar qual foi o AINE que se revelou mais eficaz, nos diferentes tempos de reacção considerados. Os valores de TEAC calculados encontram-se presentes na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Efeito antioxidante dos AINEs expresso em TEAC, cociente do $IC_{50(25)}$ do trolox pelo $IC_{50(25)}$ do fármaco, obtido, respectivamente, para os diferentes tempos de reacção no ensaio de descoloração do radical $ABTS^{\bullet+}$ e $DPPH^{\bullet}$.

AINEs	TEAC ^a ($ABTS^{\bullet+}$)				TEAC ^a ($DPPH^{\bullet}$)
	5 min	10 min	15 min	20 min	60 min
Etodolac	0,91 ± 0,01	0,96 ± 0,01	0,99 ± 0,02	1,01 ± 0,02	___*
Diclofenac	0,75 ± 0,01	0,84 ± 0,01	0,88 ± 0,02	0,91 ± 0,04	___*
Tenoxicam	1,01 ± 0,03	1,01 ± 0,01	1,01 ± 0,01	1,02 ± 0,01	0,63 ± 0,01
Piroxicam	1,07 ± 0,05	1,05 ± 0,03	1,04 ± 0,04	1,03 ± 0,04	0,41 ± 0,01
Clonixina	___*	___*	___*	___*	___*
Indoprofeno	___*	___*	___*	___*	___*

^aOs resultados correspondem à média de quatro ensaios ± o desvio padrão
*sem actividade

Pela análise da Tabela 4.1 e tendo em conta que quanto maior for o valor de TEAC maior será a actividade antioxidante apresentada pelos fármacos, foi possível ordenar os AINEs por ordem decrescente de eficácia. Para o ensaio com o radical $ABTS^{\bullet+}$ a eficácia antioxidante seguiu a seguinte ordem: tenoxicam ≈ piroxicam ≈ etodolac > diclofenac (a clonixina e o indoprofeno não apresentaram actividade antioxidante). Os oxicanos, tenoxicam e piroxicam, e o etodolac possuíram uma acção antioxidante semelhante à observada para o trolox, em todos os tempos de reacção considerados no ensaio de descoloração para o radical $ABTS^{\bullet+}$, ao contrário do diclofenac, que apresentava uma maior eficácia antioxidante quanto maior fosse o tempo de reacção.

No método descrito para o radical DPPH[•] a ordem de eficácia aos 60 min de tempo de reacção foi: tenoxicam > piroxicam; os restantes fármacos não apresentaram actividade antiradicalar face ao radical referido.

A menor actividade do diclofenac relativamente ao tenoxicam, piroxicam e etodolac no ensaio com o radical ABTS^{•+} poderá ser explicada pela presença dos grupos captadores de electrões -Cl, além do -COOH, na sua estrutura química (presentes em 1.2.5), que vão dificultar a transferência final do átomo de hidrogénio. Quanto à clonixina, a presença do átomo de cloro e do grupo carboxílico directamente ligados ao anel aromático poderá provocar uma maior perturbação nas propriedades electrónicas dos grupos vizinhos e, conseqüentemente, uma menor estabilização do radical formado, o que pode justificar a ausência de actividade antiradicalar. Quanto ao indoprofeno, a inexistência de um grupo doador de um átomo de hidrogénio poderá explicar os resultados obtidos para este fármaco. Relativamente ao ensaio com o radical DPPH[•], além dos factores mencionados na justificação da ordem de eficácia obtida para os diferentes AINEs para o radical ABTS^{•+}, o impedimento estérico presente na molécula do radical DPPH[•] pode implicar uma menor acessibilidade dos fármacos ao seu centro radicalar e, deste modo, justificar a menor eficácia antioxidante obtida para os AINEs. De facto, como referido anteriormente, apesar de alguns compostos reagirem rapidamente com o radical DPPH[•], para a maioria dos compostos descritos na literatura essa reacção é mais lenta e complexa e, portanto, o tempo de reacção usado neste estudo pode não ter sido o suficiente para se observar o fim da reacção [54, 59].

Neste contexto, pode-se concluir que os resultados obtidos, nestes estudos de descoloração, estão directamente relacionados com a estrutura química e tridimensional dos AINEs estudados.

4.4.2. Avaliação da actividade antioxidante dos AINEs face à oxidação da 2'-desoxiguanosina

Os resultados obtidos nos ensaios realizados na ausência de ácido ascórbico, mostraram que os AINEs, com excepção do diclofenac e indoprofeno, apresentaram actividade pró-oxidante, no entanto numa extensão muito menos significativa do que a observada para o antioxidante de referência (Figura 4.11). Adicionalmente, foi possível

verificar que a actividade pró-oxidante, observada para qualquer um dos compostos, aumentava com o aumento da concentração.

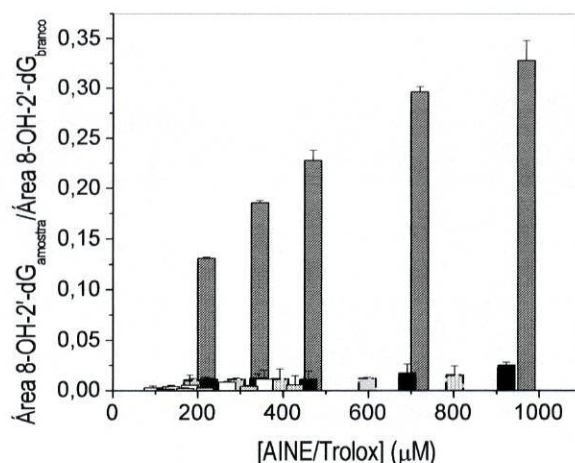


Figura 4.11: Efeito observado para os AINEs etodolac (diagonal), tenoxicam (preto), piroxicam (branco) e clonixina (cinza) e para o trolox (escura) na oxidação da 2'-dG a 8-OH-2'-dG induzida pelo sistema Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 na ausência de ácido ascórbico. Cada valor corresponde à média $\pm$ desvio padrão de 3 ensaios.

Pela observação da Figura 4.11, é ainda possível verificar que a actividade pró-oxidante apresentada pelo trolox e, consequentemente, pelos AINEs, foi muito inferior à observada para o branco com ácido ascórbico e sem o composto a testar. De facto, enquanto que o branco apresenta um valor igual a 1 (não representado na Figura 4.11), o valor máximo obtido para o trolox, no intervalo de concentrações utilizado, foi de 0,33, significativamente menor que a unidade.

A adição de ácido ascórbico ao sistema reaccional acelera a oxidação da base de ADN, uma vez que aumenta a formação de radicais $\text{HO}^\bullet$, pela redução do ião Fe^{3+} a Fe^{2+} , necessário à progressão da reacção de formação de radicais hidroxilo (equações 4.9 e 4.10). Com efeito, a capacidade do ácido ascórbico em agir como pró-oxidante está bem documentada na literatura [60, 61].

Nos ensaios realizados na presença do ácido ascórbico para a determinação da actividade antioxidante dos AINEs, não foi possível a determinação da eficácia do diclofenac em reduzir a oxidação da 2'-dG a 8-OH-2'-dG, pois verificou-se a presença de um precipitado no meio reaccional, após o período de incubação das amostras.

Na Figura 4.12 apresentam-se os resultados obtidos para os AINEs e trolox, após a realização dos ensaios, na presença de ácido ascórbico. Pela observação da

Figura 4.12, é possível concluir que, para as concentrações usadas para os vários fármacos, apenas o etodolac e o tenoxicam reduziram a oxidação da base de ADN 2'-dG a 8-OH-2'-dG na presença do sistema Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 /ácido ascórbico. É também possível verificar que o etodolac se revelou mais eficaz que o tenoxicam na inibição da oxidação referida. No entanto, enquanto que o trolox conseguiu superar o efeito pró-oxidante observado no estudo anterior em todo o intervalo de concentrações usado, os AINES etodolac e tenoxicam apenas o conseguiram quando presentes em concentrações superiores a 360 μM e 460 μM , respectivamente. Assim, só a partir dos valores de concentração referidos é que foi possível a detecção da actividade antioxidante dos AINES e a diminuição da oxidação da 2'-dG.

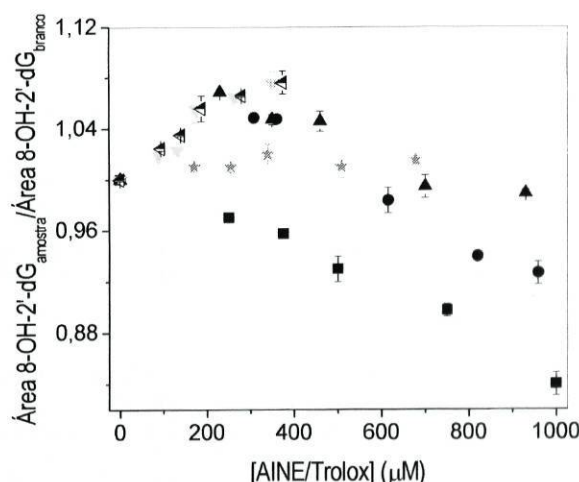


Figura 4.12: Efeito observado para os AINES etodolac (●), tenoxicam (▲), piroxicam (▼); indoprofeno (★) e clonixina (◄) e para o trolox (■) na oxidação da 2'-dG a 8-OH-2'-dG, induzida pelo radical hidroxilo, na presença de ácido ascórbico. Cada valor corresponde à média $\pm$ desvio padrão de 3 ensaios independentes.

4.4.3. Avaliação da actividade antioxidante dos AINES face aos radicais $\text{ROO}^{\bullet}$ gerados na fase aquosa e lipídica

4.4.3.1. Radicais $\text{ROO}^{\bullet}$ gerados na fase aquosa

Nestes estudos, não foi possível a determinação da actividade antioxidante do diclofenac face aos radicais peroxilo, devido à formação de um precipitado quando ao meio reaccional adicionávamos o indutor AAPH.

4.4.3.1.1. Avaliação da actividade antioxidante dos AINES usando a sonda fluoresceína

A actividade antioxidante dos AINES foi avaliada pela monitorização da oxidação da sonda fluoresceína, na ausência e na presença de lipossomas unilamelares de EPC. A introdução de lipossomas, neste estudo, complementou o ensaio descrito por Fernandes *et al* [42], pois a presença destes modelos membranares permite uma maior aproximação do que realmente acontece a nível biológico. Deste modo, os dados obtidos são mais facilmente extrapolados para situações *in vivo* do que os fornecidos nos ensaios realizados na ausência de modelos membranares. De facto, a interacção dos fármacos com as membranas biológicas, que pode ser quantificada pelo coeficiente de partição, condiciona a concentração aquosa dos fármacos, o que constitui um parâmetro importante neste método, cujo objectivo é a quantificação da actividade antioxidante dos AINES, em função da concentração de fármaco, utilizando a sonda fluoresceína hidrossolúvel.

Em seguida, são apresentados os resultados e a sua discussão dos ensaios efectuados em tampão fosfato. Os resultados obtidos no ensaio controlo para a sonda fluoresceína, nos ensaios controlo propriamente ditos e no ensaio controlo da peroxidação podem ser visualizados na Figura 4.13.

Como é possível observar na Figura 4.13, nos ensaios controlo efectuados para a sonda fluoresceína, AINES e antioxidante de referência não ocorreu uma diminuição significativa da intensidade de fluorescência da sonda fluoresceína, nas condições experimentais estabelecidas, quando comparada com a obtida no ensaio controlo de oxidação. Estes ensaios controlo permitiram, assim, garantir que sem a adição do indutor de oxidação não ocorria oxidação da sonda fluoresceína. Adicionalmente, a adição simultânea do AAPH e dos AINES em estudo ou do trolox permitiu verificar se estes possuíam actividade antioxidante, traduzida graficamente pela diminuição da velocidade de decaimento da intensidade de fluorescência comparativamente ao ensaio controlo de oxidação.

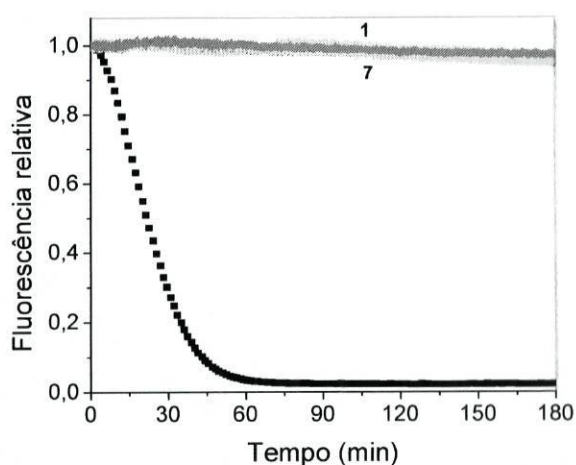


Figura 4.13: Comparação da evolução da fluorescência relativa da sonda fluoresceína (1-7), na ausência ou na presença de AINES (indoprofeno, etodolac e clonixina numa concentração de 200 μM , e 170 μM para o piroxicam e tenoxicam) ou trolox (170 μM), com a fluorescência relativa observada durante a oxidação da respectiva sonda induzida pelo AAPH (15 mM; ■), ao longo do tempo, a 37°C.

Todos os AINES estudados atrasaram, de uma forma dependente da concentração, em maior ou menor extensão, o decréscimo da intensidade de fluorescência da sonda fluoresceína, provocado pela sua oxidação pelo radical $\text{ROO}^\bullet$, relativamente ao controlo de oxidação (Figura 4.14).

Para melhor determinar a eficácia dos compostos como antioxidantes, representou-se graficamente a razão $(\text{AUC}_{\text{AINE/Trolox}} - \text{AUC}_{\text{AAPH}}) / \text{AUC}_{\text{AAPH}}$ versus a concentração dos compostos (Figura 4.15 A). A diferença de eficácia dos compostos estudados em impedir a oxidação da sonda fluoresceína reflectiu-se no valor dos seus IC_{90} , os quais são definidos como a concentração de cada composto requerida para que a razão referida apresente um valor de 90% (Tabela 4.2). Estes valores de IC_{90} , foram obtidos a partir das rectas de regressão do gráfico percentagem da razão $(\text{AUC}_{\text{AINE/Trolox}} - \text{AUC}_{\text{AAPH}}) / \text{AUC}_{\text{AAPH}}$ versus concentração de composto (Figura 4.15 B). Uma vez que a razão referida atingiu o valor de 90% para as concentrações de composto mais baixas, utilizaram-se apenas os valores obtidos até 5 μM para a representação gráfica presente na Figura 4.15 B.

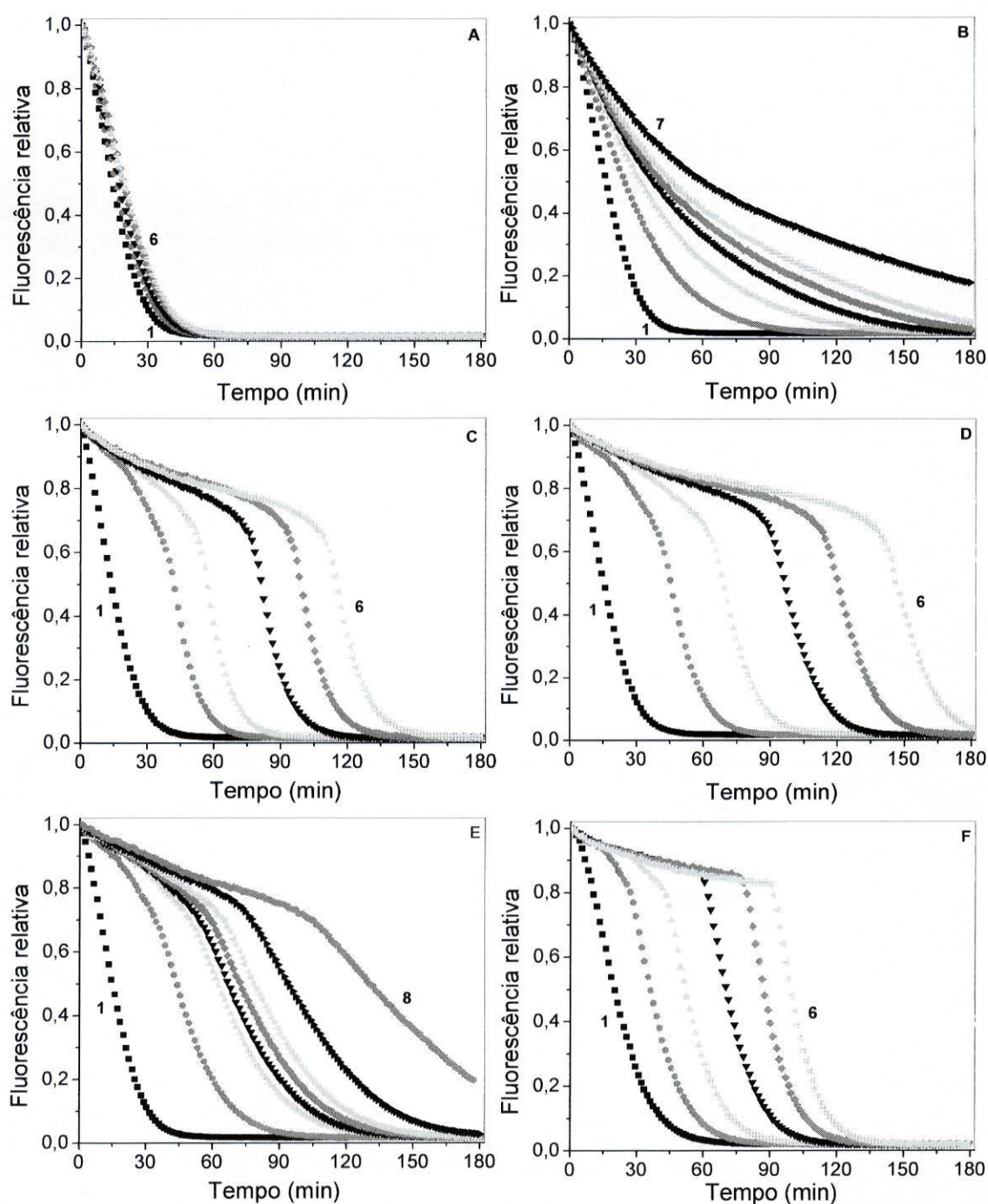


Figura 4.14: Fluorescência relativa observada durante a oxidação da sonda fluoresceína induzida pelo AAPH (15 mM) a 37°C, na presença de diferentes concentrações dos AINES indoprofeno (A: (1) 0; (2) 2; (3) 5; (4) 10; (5) 15; e (6) 20 μ M), clonixina (B: (1) 0; (2) 1; (3) 2; (4) 3; (5) 4; (6) 5; e (7) 10 μ M), tenoxicam (C: (1) 0; (2) 2; (3) 5; (4) 10; (5) 15; e (6) 20 μ M), piroxicam (D: (1) 0; (2) 2; (3) 5; (4) 10; (5) 15; e (6) 20 μ M) e etodolac (E: (1) 0; (2) 2; (3) 4; (4) 5; (5) 6; (6) 7; (7) 10; e (8) 15 μ M) e do antioxidante de referência trolox (F: (1) 0; (2) 2; (3) 5; (4) 10; (5) 15; e (6) 20 μ M).

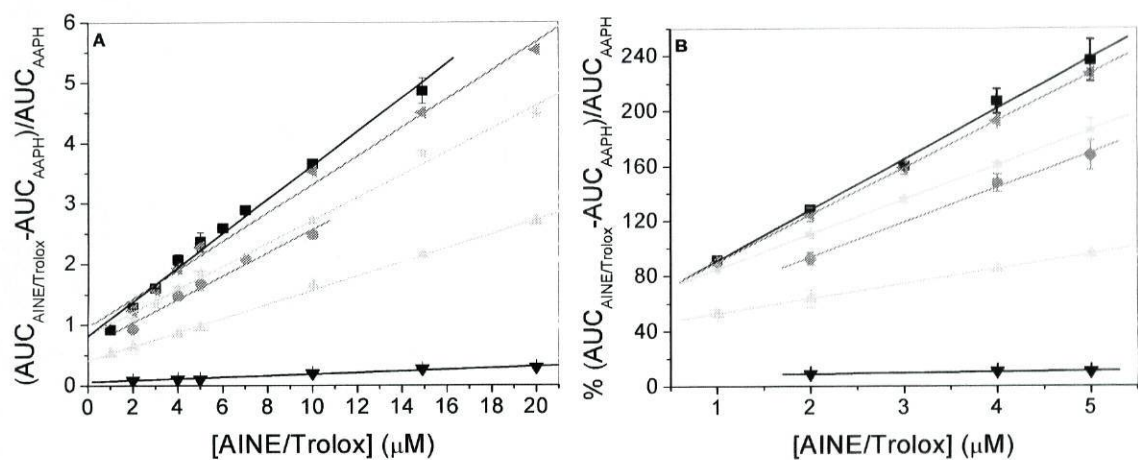


Figura 4.15: Relação entre o valor (A) ou a percentagem (B) da razão $(AUC_{AINE/Trolox} - AUC_{AAPH})/AUC_{AAPH}$ e as concentrações dos AINES (etodolac: (■); clonixina: (●); indoprofeno: (▼); tenoxicam: (*); e piroxicam: (◄)) e trolox (◄). Os valores da razão referida foram calculados a partir dos resultados de quatro experiências realizadas em triplicado (média $\pm$ desvio padrão).

Tabela 4.2: Valores de IC_{90} obtidos para o trolox e AINEs estudados nos ensaios para a avaliação da actividade antioxidante pela sonda fluoresceína na ausência e na presença de LUVs, a partir da equação das rectas de regressão da representação gráfica $\% (AUC_{AINE/Trolox} - AUC_{AAPH})/AUC_{AAPH}$ versus concentração dos respectivos compostos. Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão dos resultados obtidos em três ensaios independentes.

Compostos	IC ₉₀		
	Fluoresceína	Fluoresceína+LUVs	Fluoresceína+LUVs*
Indoprofeno	n.a. **	n.a. **	n.a. **
Clonixina	1,86 $\pm$ 0,19	3,86 $\pm$ 0,28	2,83 $\pm$ 0,28
Etodolac	0,98 $\pm$ 0,11	2,24 $\pm$ 0,23	2,24 $\pm$ 0,23
Piroxicam	1,00 $\pm$ 0,13	2,36 $\pm$ 0,14	0,95 $\pm$ 0,14
Tenoxicam	1,19 $\pm$ 0,25	2,77 $\pm$ 0,19	1,22 $\pm$ 0,19
Trolox	4,46 $\pm$ 0,66	14,00 $\pm$ 1,02	11,79 $\pm$ 1,02

* valores calculados usando a conc. de AINEs na fase aquosa

** não atinge

Pela análise da Tabela 4.2, verifica-se que os compostos em estudo possuíram efeito captador do radical peroxilo e que a ordem de eficácia obtida para os fármacos e trolox foi a seguinte: etodolac $\geq$ piroxicam > tenoxicam > clonixina > trolox > indoprofeno. Pela observação da ordem obtida, pode-se concluir que os AINEs em estudo, com excepção do indoprofeno, apresentaram uma actividade antioxidante superior à do trolox, o composto utilizado como antioxidante de referência.

A actividade antioxidante demonstrada pelos AINEs em estudo poderá ser explicada, tendo em conta o mecanismo de acção dos radicais peroxilo, pela presença de grupos doadores de hidrogénio, como -OH, -NH e -SH nas moléculas dos fármacos (presentes em 1.2.5 no capítulo 1). Adicionalmente, a presença dos grupos captadores de electrões -COOH e -Cl directamente ligados aos anéis aromáticos, poderá explicar a menor actividade antioxidante da clonixina relativamente aos AINEs etodolac, piroxicam e tenoxicam. Quanto ao indoprofeno, a inexistência de um grupo doador de hidrogénio na sua estrutura química poderá explicar os resultados obtidos para este fármaco.

Nos ensaios efectuados em presença de lipossomas unilamelares de EPC em tampão fosfato, comparativamente ao ensaio com a sonda fluoresceína na ausência de LUVs, houve necessidade de aumentar a concentração de AAPH, uma vez que com a concentração de 15 mM de AAPH não se obtinha uma inibição completa da intensidade de fluorescência. Assim, foram testadas várias concentrações de AAPH para uma mesma concentração de sonda fluoresceína e de EPC (Figura 4.16). A concentração do iniciador da oxidação escolhida foi a de 25 mM, pois com este valor de concentração era possível garantir uma diminuição da intensidade de fluorescência (oxidação da fluoresceína) completa no tempo de reacção considerado (180 min).

O aumento da concentração de AAPH neste ensaio, relativamente ao efectuado com a sonda fluoresceína na ausência de lipossomas de EPC, pode ser explicado pelo facto dos radicais peroxilo formados se poderem difundir também para o interior das membranas e, conseqüentemente, parte dos radicais ROO[•] serão consumidos na oxidação dos ácidos gordos polinsaturados aí presentes. Deste modo, um menor número de radicais peroxilo vai estar disponível para oxidar a sonda fluoresceína, sendo assim necessário aumentar a concentração de AAPH para que a oxidação da sonda seja mais rápida e completa, no mesmo intervalo de tempo do estudo anterior.

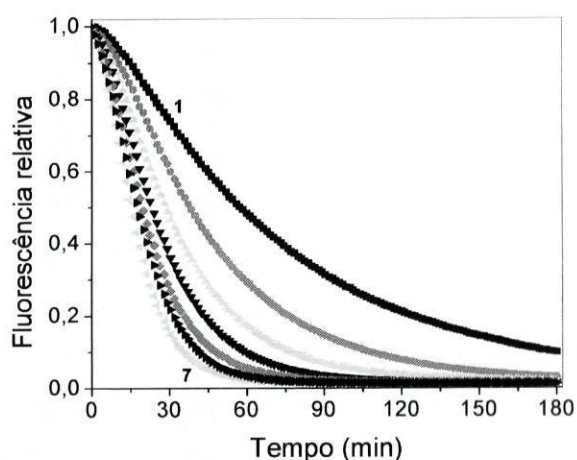


Figura 4.16: Fluorescência relativa observada durante o ensaio de oxidação da sonda fluoresceína na presença de lipossomas unilamelares de EPC, a 37°C, com as seguintes concentrações de AAPH: (1) 10; (2) 15; (3) 20; (4) 25; (5) 30; (6) 40; e (7) 50 mM.

Os ensaios controlo efectuados, neste estudo, diferiram dos anteriores pela presença de lipossomas unilamelares de EPC no meio reaccional. Na Figura 4.17 é possível observar os resultados obtidos nos diferentes ensaios controlo efectuados. Assim, pela observação da Figura 4.17, pode-se concluir que, tal como no estudo anterior, não se verificou uma diminuição significativa da intensidade de fluorescência nos ensaios controlo realizados para a sonda fluoresceína, AINEs e trolox, quando comparada com a obtida no ensaio controlo de oxidação.

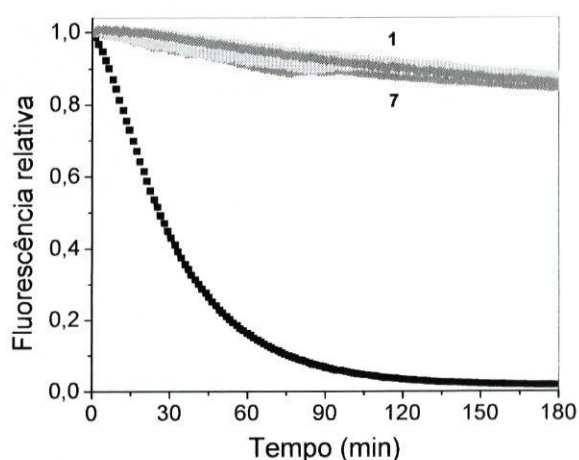


Figura 4.17: Comparação da evolução da fluorescência relativa da sonda fluoresceína na presença de 800 μ M de LUVs (1-7), sem ou com a adição de AINEs (indoprofeno, etodolac e clonixina numa concentração de 200 μ M, e 170 μ M para o piroxicam e tenoxicam) ou trolox (170 μ M), com a fluorescência relativa observada durante a oxidação da respectiva sonda induzida pelo AAPH (25 mM; ■), ao longo do tempo, a 37°C.

A monitorização do decréscimo da intensidade de fluorescência, ao longo do tempo na presença do AAPH e na ausência e na presença dos AINES ou do antioxidante de referência, permitiu verificar, como no estudo anterior, se os compostos em estudo apresentavam actividade antioxidante (Figura 4.18). Pela observação da Figura 4.18, podemos concluir que a actividade antioxidante dos AINES estudados é dependente da concentração.

A representação gráfica da razão $(AUC_{\text{AINE/Trolox}} - AUC_{\text{AAPH}})/AUC_{\text{AAPH}}$ *versus* a concentração dos compostos (Figura 4.19 A) permitiu uma melhor comparação entre os vários compostos relativamente às suas eficácias antioxidantes. Assim como no ensaio em que se usou a fluoresceína na ausência de lipossomas, também neste estudo se procedeu ao cálculo dos valores de IC_{90} a partir das equações das rectas obtidas da percentagem da razão $(AUC_{\text{AINE/Trolox}} - AUC_{\text{AAPH}})/AUC_{\text{AAPH}}$ até uma concentração de aproximadamente 5 μM de AINE ou trolox (Figura 4.19 B e Tabela 4.2).

Os AINES estudados e o trolox puderam ser ordenados em termos de eficácia antioxidante face ao radical peroxilo, da seguinte maneira: etodolac $\geq$ piroxicam > tenoxicam > clonixina > trolox > indoprofeno. A ordem de eficácia obtida está de acordo com a obtida no ensaio com a sonda fluoresceína na ausência de lipossomas e em tampão fosfato. No entanto, se se considerar que parte destes fármacos partilha com os LUVs presentes no meio reaccional e que apenas a concentração dos compostos presente na fase aquosa é a directamente responsável pela protecção da sonda fluoresceína à oxidação, poder-se-á recalculer os valores de IC_{90} . O cálculo destes valores será efectuado numa representação gráfica, em tudo semelhante à anterior (Figura 4.19 B), mas cujos dados de origem compreendem a percentagem da razão $(AUC_{\text{AINE/Trolox}} - AUC_{\text{AAPH}})/AUC_{\text{AAPH}}$ e as concentrações dos compostos na fase aquosa e não as suas concentrações totais.

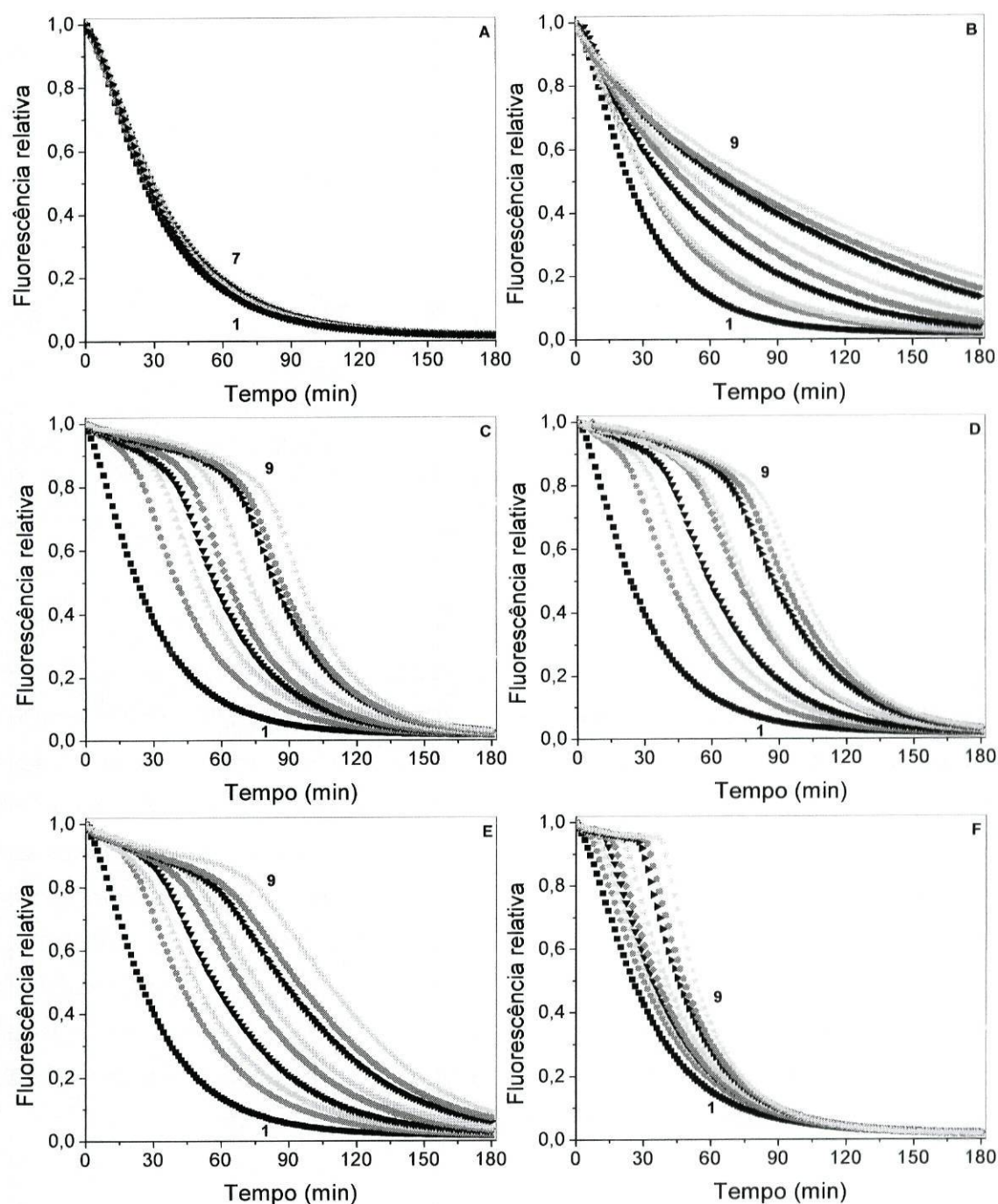


Figura 4.18: Fluorescência relativa observada durante a oxidação da sonda fluoresceína induzida pelo AAPH (25 mM), na presença de LUVs (800 μM), a 37°C, e perante a adição de diferentes concentrações dos AINEs indoprofeno (A: (1) 0; (2) 2; (3) 5; (4) 8; (5) 10; (6) 12; e (7) 15 μM), clonixina (B: (1) 0; (2) 0,6; (3) 1; (4) 2; (5) 3; (6) 5; (7) 8; (8) 10; e (9) 15 μM), tenoxicam (C: (1) 0; (2) 0,5; (3) 1; (4) 2; (5) 3; (6) 5; (7) 8; (8) 10; e (9) 15 μM), piroxicam (D: (1) 0; (2) 0,5; (3) 1; (4) 2; (5) 4; (6) 5; (7) 8; (8) 10; e (9) 15 μM) e etodolac (E: (1) 0; (2) 0,6; (3) 1; (4) 2; (5) 4; (6) 5; (7) 8; (8) 10; e (9) 15 μM) e do antioxidante de referência trolox (F: (1) 0; (2) 0,4; (3) 1; (4) 2; (5) 3; (6) 5; (7) 8; (8) 10; e (9) 15 μM).

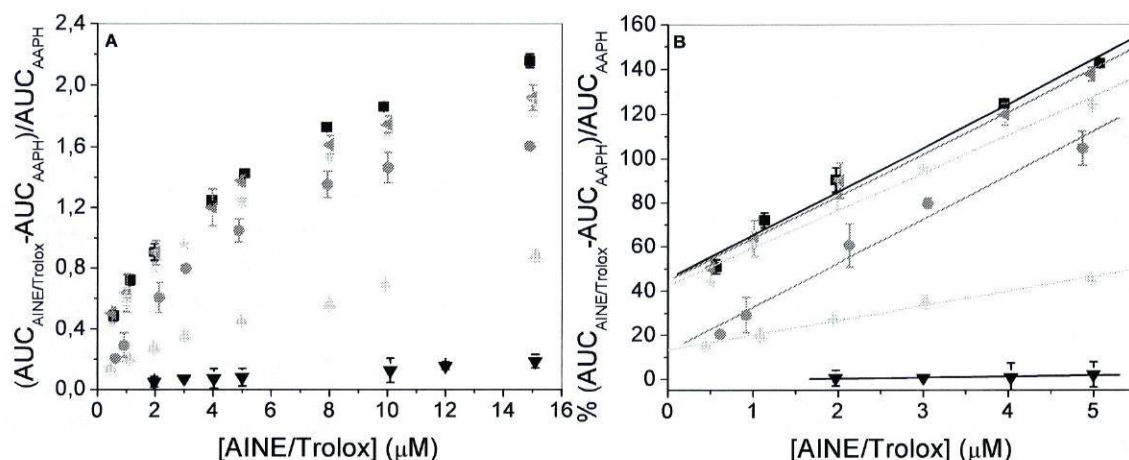


Figura 4.19 A: Representação gráfica da razão $(AUC_{AINE/Trolox} - AUC_{AAPH}) / AUC_{AAPH}$ versus concentrações dos AINES e trolox. B: Regressão linear da relação entre a percentagem da razão $(AUC_{AINE/Trolox} - AUC_{AAPH}) / AUC_{AAPH}$ e as concentrações dos AINES e trolox. (■) etodolac; (●) clonixina; (▼) indoprofeno; (□) tenoxicam; (△) piroxicam; e (○) trolox. Os valores da razão referida foram calculados a partir dos resultados de três experiências realizadas em quadruplicado (média $\pm$ desvio padrão).

A determinação do valor da concentração dos fármacos na fase aquosa foi feita a partir da equação 3.3, apresentada no capítulo 3. Com efeito, o conhecimento do valor do coeficiente de partição dos compostos e da sua concentração na fase membranar (calculada a partir da equação 3.39 também incluída no capítulo 3) permitiu o cálculo da concentração dos mesmos na fase aquosa. Para o etodolac e indoprofeno, a concentração na fase aquosa correspondeu à concentração total, uma vez que estes fármacos não partilham nas condições do ensaio (o que foi corroborado pelos estudos de determinação de K_p e de desactivação de fluorescência). Quanto ao antioxidante usado como referência, encontra-se descrito na literatura que o trolox partilha aproximadamente 20% na fase lipídica dos lipossomas [17]. Considerando este valor de partilha foi, então, também possível calcular a concentração do trolox na fase aquosa.

A representação gráfica da razão $(AUC_{AINE/Trolox} - AUC_{AAPH}) / AUC_{AAPH}$ versus os valores calculados da concentração dos compostos na fase aquosa (Figura 4.20 A) permitiu verificar que a dispersão apresentada pelos pontos experimentais foi a mesma, embora para valores de concentrações inferiores, que a obtida quando se considerou as concentrações totais. Para calcular os valores de IC_{90} , consideraram-se apenas as concentrações na fase aquosa correspondentes ao intervalo de concentrações totais considerado anteriormente para a determinação desses mesmos valores (Figura 4.20 B).

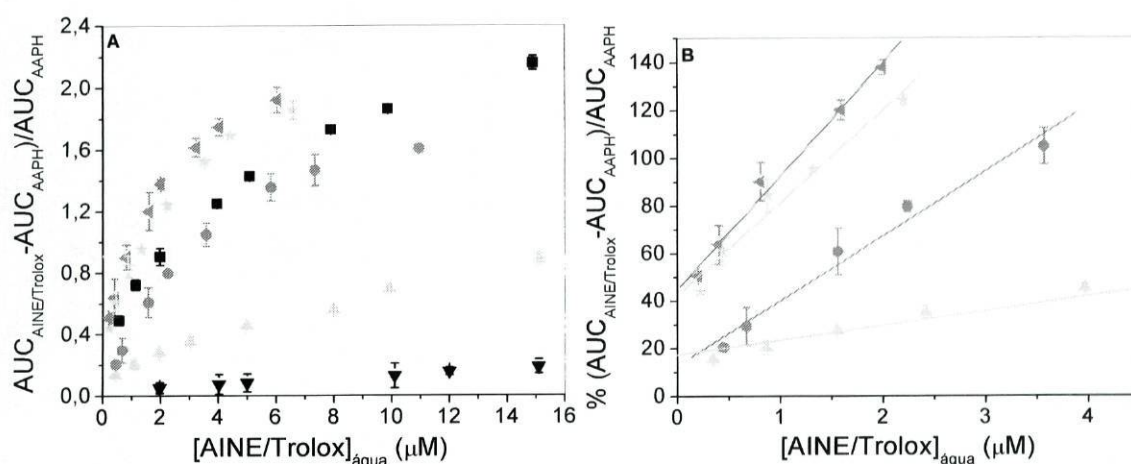


Figura 4.20 A: Representação gráfica da razão $(AUC_{AINE/Trolox} - AUC_{AAPH})/AUC_{AAPH}$ versus concentrações dos AINEs e trolox. B: Regressão linear da relação entre a percentagem da razão $(AUC_{AINE/Trolox} - AUC_{AAPH})/AUC_{AAPH}$ e as concentrações dos AINEs e trolox. (●) clonixina; (◐) tenoxicam; (◑) piroxicam; (■) etodolac; (▼) indoprofeno; e (▲) trolox. Os valores da razão referida foram calculados a partir dos resultados de três experiências realizadas em quadruplicado (média $\pm$ desvio padrão).

Pela análise da Tabela 4.2, pode-se verificar que, se se considerar a concentração na fase aquosa dos compostos, a ordem de eficácia obtida (piroxicam > tenoxicam > etodolac > clonixina > trolox > indoprofeno) é diferente da obtida com as concentrações totais e, conseqüentemente, com a obtida com a sonda fluoresceína na ausência de LUVs. No entanto, seria de esperar que a ordem e os valores de IC_{90} , calculados a partir das rectas de regressão obtidas na representação gráfica que considera as concentrações na fase aquosa dos compostos, fossem semelhantes aos obtidos no ensaio efectuado com a sonda fluoresceína na ausência de LUVs, uma vez que, deste modo, haveria na solução aquosa dos dois ensaios, concentrações semelhantes dos vários compostos. De facto, para os AINEs piroxicam e tenoxicam, esta hipótese confirmou-se. No entanto, para os compostos etodolac, clonixina e trolox verificou-se que era necessária uma concentração superior para obter o mesmo efeito obtido no ensaio com a sonda fluoresceína em tampão fosfato. O aumento da concentração observado pode estar relacionado com o facto dos compostos em questão poderem estabelecer interacções electrostáticas com a superfície membranar, uma vez que estes AINES e o trolox (pK_a igual a $3,89 \pm 0,03$ [17]) estão presentes, predominantemente, nas suas formas carregadas negativamente, ao valor de pH usado na realização destes estudos. Deste modo, parte das moléculas de fármaco e do antioxidante de referência, presentes na solução aquosa, não estarão tão

disponíveis para proteger a sonda fluoresceína da oxidação, pois encontram-se localizados na proximidade da superfície membranar, tornando necessária uma concentração superior de composto para se obter o mesmo efeito antioxidante. Por outro lado, os oxicamos estudados são iões dipolares estáveis a um valor de pH igual a 7,4, podendo estabelecer interacções intramoleculares (ligação de hidrogénio entre o grupo OH enólico e o grupo C=O da amida [62]), o que justifica a maior hidrofobicidade observada para estes fármacos (maior valor de K_p). Deste modo, a capacidade para estabelecerem interacções electrostáticas com a superfície da membrana não deve ser tão significativa como a observada para os compostos anteriores e daí os valores de IC_{90} obtidos, quando se considera apenas as concentrações na fase aquosa, serem semelhantes aos obtidos no ensaio com a sonda fluoresceína na ausência de LUVs.

4.4.3.1.2. Avaliação da actividade antioxidante dos AINEs usando a sonda HDAF

Para a optimização deste ensaio, foram testadas diferentes concentrações quer de HDAF, quer de AAPH para uma mesma concentração de EPC (igual à do ensaio com a sonda fluoresceína). Relativamente à sonda HDAF, tendo em conta o que se encontrava descrito na literatura [44], testaram-se as seguintes concentrações no meio reaccional: $1,3 \times 10^{-10}$ M, $4,8 \times 10^{-10}$ M, $1,3 \times 10^{-8}$ M, $1,3 \times 10^{-7}$ M e $4,0 \times 10^{-7}$ M. Para cada uma destas concentrações de HDAF nos lipossomas, foi experimentada uma gama de concentrações do gerador de radicais AAPH (0 a 110 mM). Para as duas menores concentrações de HDAF usadas ($1,3 \times 10^{-10}$ M e $4,8 \times 10^{-10}$ M), além do decaimento da intensidade de fluorescência não ser tão acentuado (mantendo-se sempre com valores elevados de intensidade de fluorescência) como para as mais concentradas na presença de uma mesma concentração de AAPH, não havia uma separação nítida do decréscimo da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de AAPH. Com a concentração de HDAF igual a $1,3 \times 10^{-8}$ M, $1,3 \times 10^{-7}$ M e $4,0 \times 10^{-7}$ M essas diferenças já se começavam a verificar. No entanto, nos ensaios realizados com as concentrações de $1,3 \times 10^{-7}$ M e $4,0 \times 10^{-7}$ M, a descida da intensidade de fluorescência era mais acentuada do que a verificada para a $1,3 \times 10^{-8}$ M e como não havia uma grande diferença entre as primeiras duas concentrações, optou-se pela concentração de $1,3 \times 10^{-7}$ M no meio reaccional.

Uma vez escolhida a concentração de HDAF a usar neste estudo, tornou-se possível a determinação da concentração de AAPH mais adequada. Esta concentração de iniciador da peroxidação lipídica deveria provocar uma diminuição da intensidade de fluorescência tanto maior quanto possível, a qual iria corresponder à oxidação máxima da sonda obtida no ensaio. Assim, realizaram-se ensaios com concentrações crescentes de AAPH (0 a 270 mM; Figura 4.21).

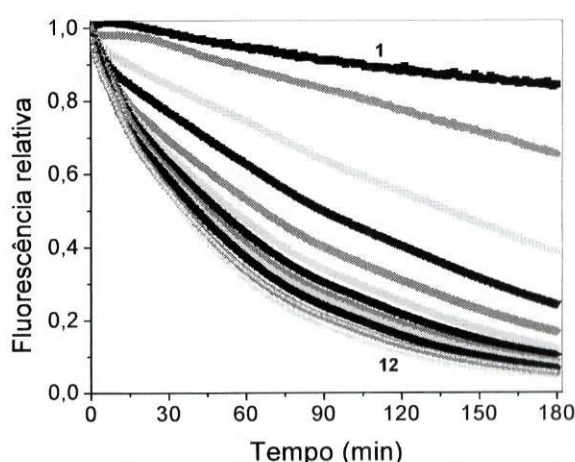


Figura 4.21: Fluorescência relativa observada durante o ensaio de oxidação, a 37°C, com lipossomas unilamelares (LUVs) marcados com a sonda HDAF, na presença de diferentes concentrações de AAPH: (1) 0; (2) 20; (3) 60; (4) 100; (5) 130; (6) 160; (7) 180; (8) 200; (9) 210; (10) 230; (11) 250; e (12) 270 mM.

Como se pode observar na Figura 4.21, nem mesmo com uma concentração de 270 mM de AAPH, se obtinha uma oxidação completa da sonda presente no meio reaccional, ao fim de 180 min. Assim, tornou-se necessário aumentar o tempo de reacção.

Tendo em conta que para uma mesma concentração de fármaco, quanto maior for a concentração de AAPH, menor será a eficácia antioxidante apresentada pelo composto em estudo (Figura 4.22), e, uma vez que a diferença observada no decaimento da intensidade de fluorescência provocado pelas concentrações de 200 e 270 mM de AAPH não era muito significativa, optou-se por usar a concentração de 200 mM num tempo de reacção de 360 min.

O aumento significativo da concentração de AAPH neste ensaio, relativamente aos outros ensaios que utilizaram este iniciador, pode ser explicado pelo facto da

sonda HDAF não ser tão facilmente oxidada pelos radicais peróxido, devido à sua localização e concentração.

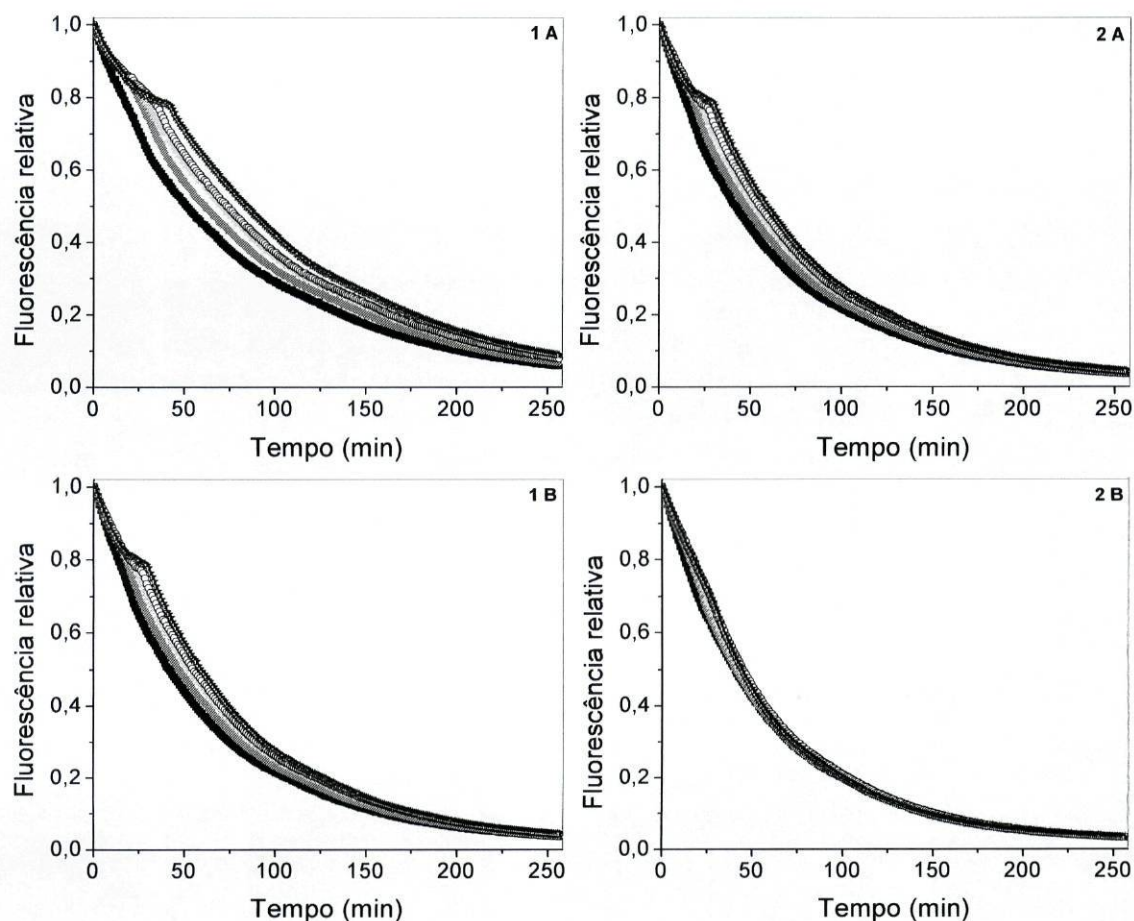


Figura 4.22: Fluorescência relativa observada durante a peroxidação de lipossomas unilamelares (LUVs) marcados com a sonda HDAF, induzida por 200 (1) ou 270 mM (2) de AAPH, a 37° C, e perante a adição de diferentes concentrações de trolox (A; (■) 0; (●) 31; (▲) 54; (○) 77; e (★) 107 μ M) e tenoxicam (B; (■) 0; (●) 24; (▲) 42; (○) 60; e (★) 84 μ M).

Os ensaios controlo efectuados para a sonda, AINEs e antioxidante de referência mostraram que a diminuição da intensidade de fluorescência da sonda HDAF incorporada nos LUVs, durante o intervalo de tempo necessário para realizar o ensaio, não era significativa quando comparado com o ensaio controlo de oxidação, como é possível visualizar na Figura 4.23.

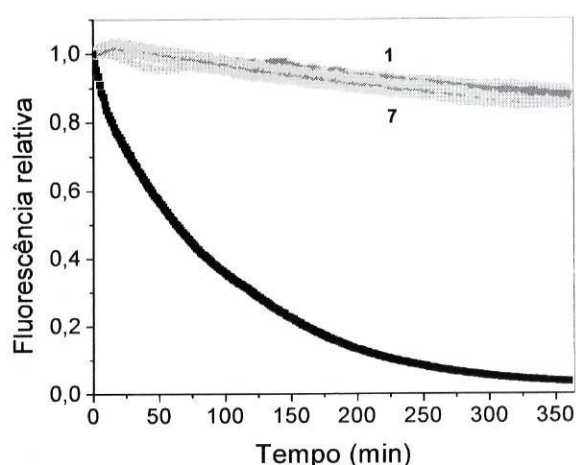


Figura 4.23: Comparação da evolução da fluorescência relativa da sonda HDAF incorporada em lipossomas unilamelares (1-7), com ou sem a adição de AINEs (indoprofeno e etodolac numa concentração de 293 μM , 363 μM para a clonixina, 147 μM para o tenoxicam e 206 μM para o piroxicam) ou trolox (183 μM), com a fluorescência relativa observada durante a oxidação da respectiva sonda induzida pelo AAPH (200 mM; ■), ao longo do tempo, a 37°C.

Na Figura 4.24 é possível observar se os AINEs em estudo ou o trolox apresentaram ou não actividade antioxidante nas condições experimentais estabelecidas, através da comparação do decaimento da intensidade de fluorescência da sonda HDAF na presença de diferentes concentrações de composto com o obtido no ensaio controlo de oxidação, ou seja, sem a adição do composto em estudo ao meio reaccional. Deste modo, quanto mais retardada for a descida da intensidade de fluorescência, maior será a eficácia antioxidante do composto em questão.

Os AINEs estudados apresentaram actividade antioxidante de uma forma dependente da concentração, com excepção da clonixina, que demonstrou ter propriedades pró-oxidantes (Figura 4.24 B), nas condições experimentais estabelecidas para a realização do ensaio. No entanto, a análise das Figuras 4.23 e 4.24 B permite concluir que a actividade pró-oxidante da clonixina surge, apenas, após a adição do indutor de oxidação ao meio reaccional.

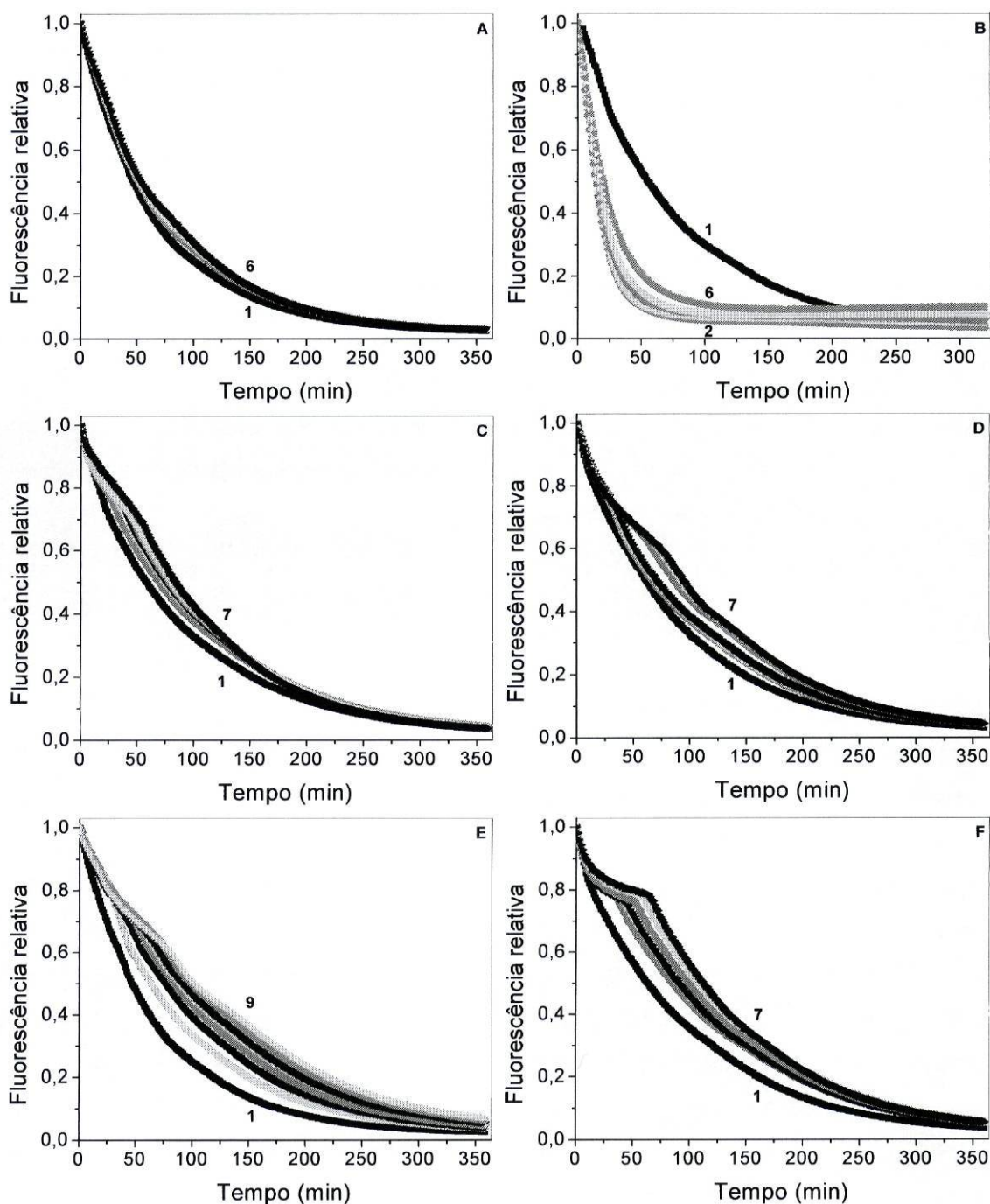


Figura 4.24: Fluorescência relativa observada durante a oxidação da sonda HDAF, incorporada em lipossomas unilamelares (LUVs), induzida por AAPH (200 mM), a 37° C, na presença de diferentes concentrações dos AINES indoprofeno (A: (1) 0; (2) 67; (3) 93; (4) 147; (5) 184; e (6) 293 μM), clonixina (B: (1) 0; (2) 67; (3) 117; (4) 167; (5) 233; e (6) 363 μM), tenoxicam (C: (1) 0; (2) 40; (3) 67; (4) 73; (5) 93; (6) 120; e (7) 147 μM), piroxicam (D: (1) 0; (2) 60; (3) 66; (4) 73; (5) 148; (6) 184; (7) 206 μM) e etodolac (E: (1) 0; (2) 67; (3) 73; (4) 120; (5) 147; (6) 184; (7) 200; (8) 240; e (9) 293 μM) e do antioxidante de referência trolox (F: (1) 0; (2) 67; (3) 73; (4) 93; (5) 120; (6) 147; e (7) 183 μM).

A representação gráfica dos resultados obtidos para cada uma das concentrações de composto usadas, após o cálculo da percentagem da razão $(AUC_{\text{AINE/Trolox}} - AUC_{\text{AAPH}})/AUC_{\text{AAPH}}$ (Figura 4.25), permitiu a obtenção dos valores de IC_{50} (concentração de cada composto necessária para que a razão referida apresente um valor de 50%). Os valores deste parâmetro, presentes na Tabela 4.3, permitiram a ordenação dos compostos estudados em termos de eficácia na prevenção da oxidação da sonda HDAF do seguinte modo: etodolac > trolox > piroxicam > tenoxicam > indoprofeno. Estes resultados corroboram os dados obtidos nos ensaios com a sonda fluoresceína, pois, uma vez mais, demonstram que os compostos considerados apresentam capacidade captadora dos radicais $ROO^{\bullet}$. Contudo, como neste estudo a sonda utilizada para avaliar a actividade antioxidante dos AINES apresenta a sua parte susceptível de oxidação localizada junto à parte hidrofílica dos fosfolípidos, é de prever que os compostos, que se situem mais próximos da parte polar da bicamada, apresentem maior actividade antioxidante. De facto, a maior actividade demonstrada pelo etodolac e trolox pode ser explicada pela razão enunciada anteriormente, aquando da explicação da ordem de eficácia obtida para o ensaio realizado com a sonda fluoresceína na presença de LUVs, considerando apenas a concentração dos compostos na fase aquosa. Assim, a carga negativa apresentada por estes dois compostos, a um valor de pH igual a 7,4, permitia o estabelecimento de interacções electrostáticas com os grupos polares da membrana e, consequentemente, uma maior aproximação destas moléculas à superfície membranar. Além do efeito demonstrado pelos AINES ao nível da solução aquosa, poderia-se, também, ter em conta a localização membranar dos AINES e do trolox para explicar a eficácia antioxidante obtida. Com efeito, poderia-se supor que os compostos, que apresentassem uma localização mais superficial no interior da bicamada, deveriam apresentar maior capacidade em proteger a sonda HDAF da oxidação pelos radicais peróxido. De facto, os AINES em estudo, assim como o trolox [17], após partilha, localizam-se preferencialmente na proximidade da parte polar da bicamada, o que também pode ter contribuído para a actividade antioxidante observada para os diferentes compostos.

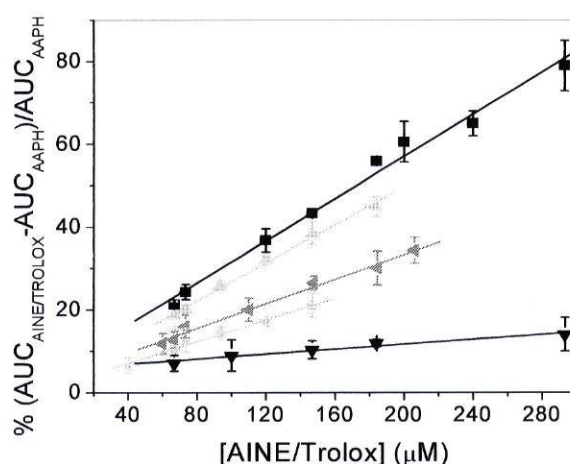


Figura 4.25: Regressão linear entre a percentagem da razão $(AUC_{\text{AINE/Trolox}} - AUC_{\text{AAPH}})/AUC_{\text{AAPH}}$ e as concentrações usadas de AINEs e trolox. (●) tenoxicam; (▲) piroxicam; (■) etodolac; (▼) indoprofeno; e (●) trolox. Os valores da razão referida foram calculados a partir dos resultados de três experiências realizadas em duplicado (média $\pm$ desvio padrão).

Tabela 4.3: Valores de IC_{50} ($\pm$ desvio padrão), obtidos para o trolox e AINEs estudados nos ensaios para avaliação da actividade antioxidante pela sonda HDAF, a partir da equação das rectas de regressão da representação gráfica $\%(AUC_{\text{AINE/Trolox}} - AUC_{\text{AAPH}})/AUC_{\text{AAPH}}$ versus concentração dos respectivos compostos.

Compostos	HDAF (IC_{50})
Indoprofeno	n.a.*
Clonixina	Pró-oxidante
Etodolac	172 ± 18
Piroxicam	296 ± 31
Tenoxicam	n.a.*
Trolox	201 ± 20

* não atinge

4.4.3.1.3. Avaliação da actividade antioxidante dos AINEs usando a sonda DPH-PA

O estudo da peroxidação lipídica pela sonda DPH-PA complementou, como já referido anteriormente, o ensaio descrito por Arora *et al* para a avaliação da actividade

antioxidante de flavonóides [24]. Estes autores apenas avaliavam o decaimento da intensidade de fluorescência da sonda DPH-PA, devido à sua susceptibilidade em ser oxidada, uma vez que apresenta na sua estrutura química ligações duplas conjugadas (Figura 4.1 C), com as quais as espécies radicalares podem reagir. Deste modo, a sonda DPH-PA pode indirectamente reflectir o grau de peroxidação lipídica.

É bem conhecida, contudo, a existência de uma relação entre a peroxidação lipídica e a fluidez da membrana. De facto, as espécies reactivas de oxigénio têm a capacidade de oxidar os fosfolípidos polinsaturados, sendo responsáveis pelas alterações na composição e nas propriedades físicas das membranas, como por exemplo, modificações da fluidez membranar [21, 31, 36, 63-65]. Assim, na avaliação da actividade antioxidante dos AINEs pela sonda DPH-PA, procedeu-se igualmente ao estudo do efeito dos AINEs clonixina, indoprofeno, etodolac, tenoxicam e piroxicam na fluidez da membrana durante a peroxidação lipídica dos lipossomas. Deste modo, a degradação peroxidativa da sonda DPH-PA pode ser observada quer pela diminuição da sua intensidade de fluorescência, quer pelo aumento da fluidez membranar por anisotropia de fluorescência, uma vez que a oxidação diminui a fluidez da membrana [66, 67]. A Figura 4.26 ilustra a peroxidação lipídica em LUVs induzida pelo AAPH, a 37°C, simultaneamente pelo decréscimo da intensidade de fluorescência da sonda e pelo aumento da anisotropia, ao longo do tempo.

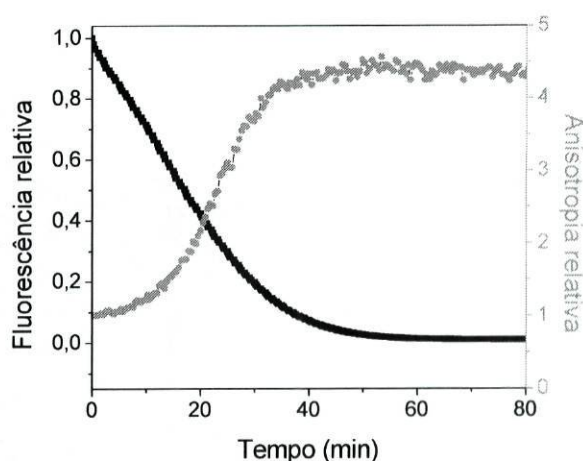


Figura 4.26: Fluorescência/anisotropia relativas observadas durante a peroxidação de lipossomas unilamelares (800 μ M) induzida por AAPH (15 mM), a 37°C.

O ensaio controlo, relativo aos lipossomas contendo a sonda fluorescente DPH-PA, na ausência do oxidante e do antioxidante, apresentou valores de intensidade de fluorescência muito estáveis, durante todo o curso do ensaio (mais de 90% após 60 min), como é possível observar na Figura 4.27 A. O mesmo se verificou para os ensaios controlo efectuados com os antioxidantes de referência e os AINES em estudo, uma vez que o decréscimo da intensidade de fluorescência não era significativo quando comparado com o ensaio controlo de peroxidação (Figura 4.27 A). Os ensaios controlo efectuados para as determinações de anisotropia de fluorescência, também demonstraram que não havia um aumento da rigidificação da membrana significativo na ausência do indutor da peroxidação, como é possível verificar na Figura 4.27 B.

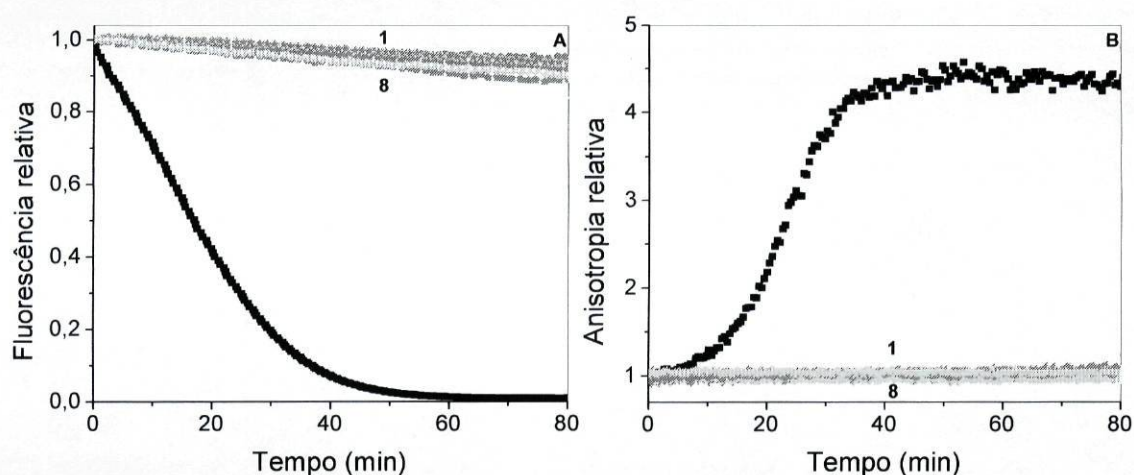


Figura 4.27: Comparação da fluorescência (A) e anisotropia (B) relativas, ao longo do tempo, da sonda DPH-PA incorporada em LUVs (1-8), na ausência e na presença dos AINES (122 μM de tenoxicam, 109 μM de piroxicam, 170 μM de etodolac, 144 μM de indoprofeno e 222 μM de clonixina) ou dos antioxidantes de referência (20 μM de trolox e 16 μM de vitamina E), com a fluorescência/anisotropia relativa observada durante a oxidação da respectiva sonda induzida pelo AAPH (15 mM; ■), a 37°C.

A comparação do decréscimo da intensidade de fluorescência ou o aumento da anisotropia (rigidificação da membrana), na presença de diferentes concentrações de composto relativamente ao controlo de peroxidação, permitiu verificar se os AINES em estudo e os antioxidantes de referência utilizados apresentavam ou não actividade antioxidante nas condições experimentais estabelecidas (Figuras 4.28, 4.29, 4.30 e 4.31).

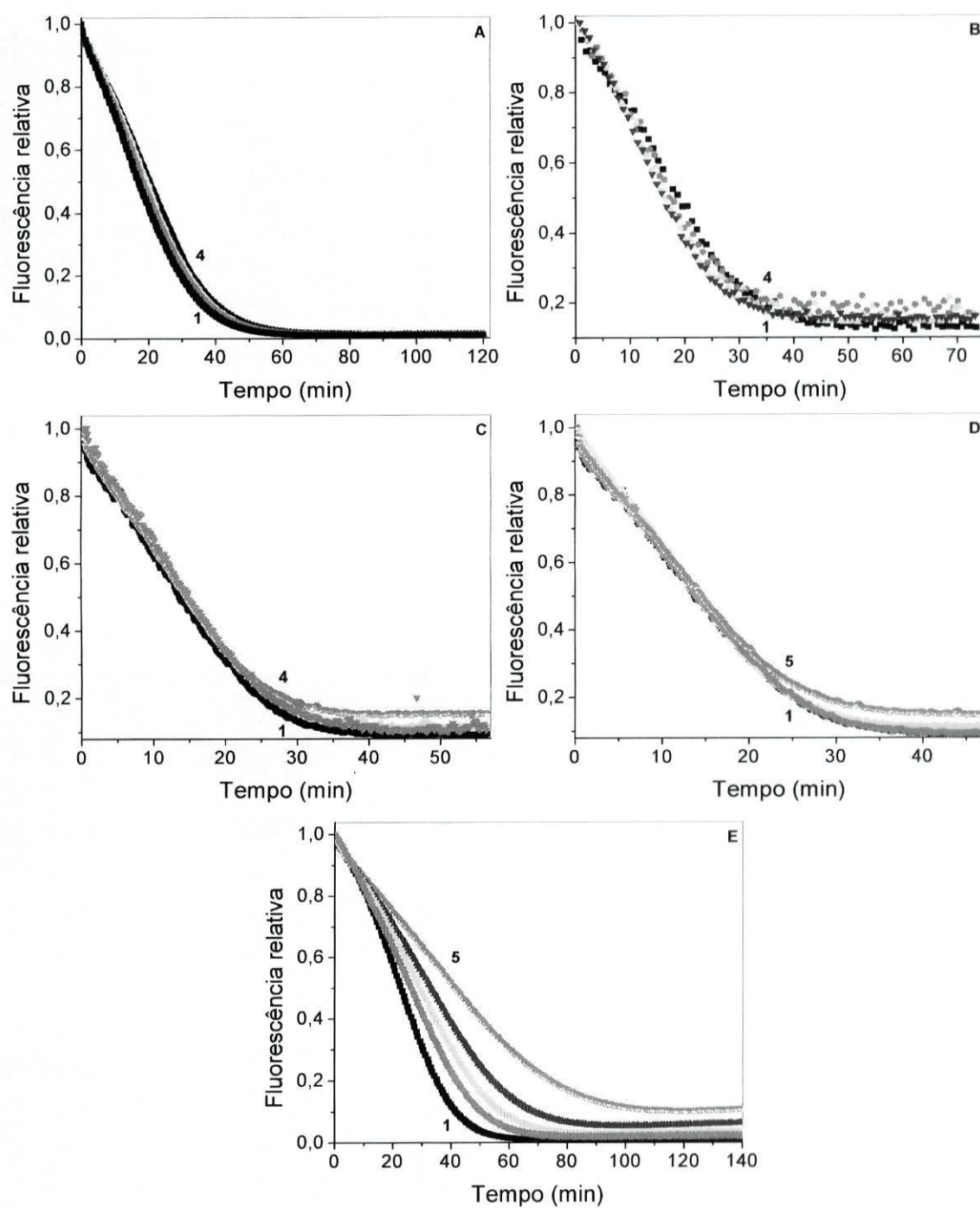


Figura 4.28: Fluorescência relativa observada durante a peroxidação de lipossomas unilamelares, com a sonda DPH-PA incorporada, induzida pelo AAPH (15 mM) a 37°C e perante a adição de diferentes concentrações dos AINEs indoprofeno (A: (1) 0; (2) 36; (3) 72; e (4) 144 μM), clonixina (B: (1) 0; (2) 56; (3) 111; e (4) 222 μM), tenoxicam (C: (1) 0; (2) 30; (3) 61; e (4) 122 μM), piroxicam (D: (1) 0; (2) 20; (3) 34; (4) 54; e (5) 109 μM) e etodolac (E: (1) 0; (2) 13; (3) 42; (4) 85; e (5) 170 μM).

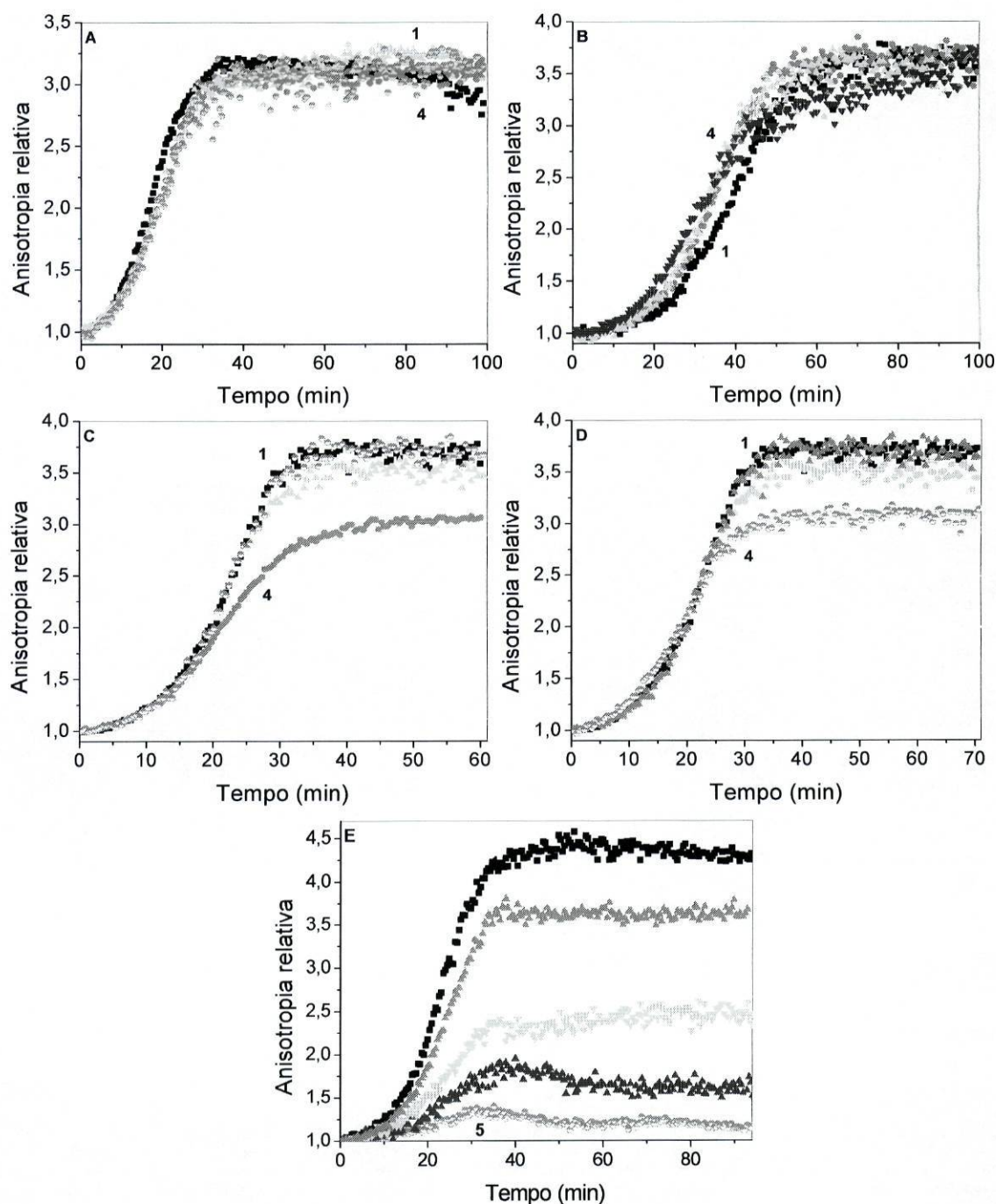


Figura 4.29: Anisotropia relativa observada durante a peroxidação de lipossomas unilamelares, com a sonda DPH-PA incorporada, induzida pelo AAPH (15 mM) a 37°C e perante a adição de diferentes concentrações dos AINES indoprofeno (A: (1) 0; (2) 36; (3) 72; e (4) 144 μM), clonixina (B: (1) 0; (2) 56; (3) 111; e (4) 222 μM), tenoxicam (C: (1) 0; (2) 30; (3) 61; e (4) 122 μM) piroxicam (D: (1) 0; (2) 20; (3) 34; (4) 54; e (5) 109 μM) e etodolac (E: (1) 0; (2) 13; (3) 42; (4) 85; e (5) 170 μM).

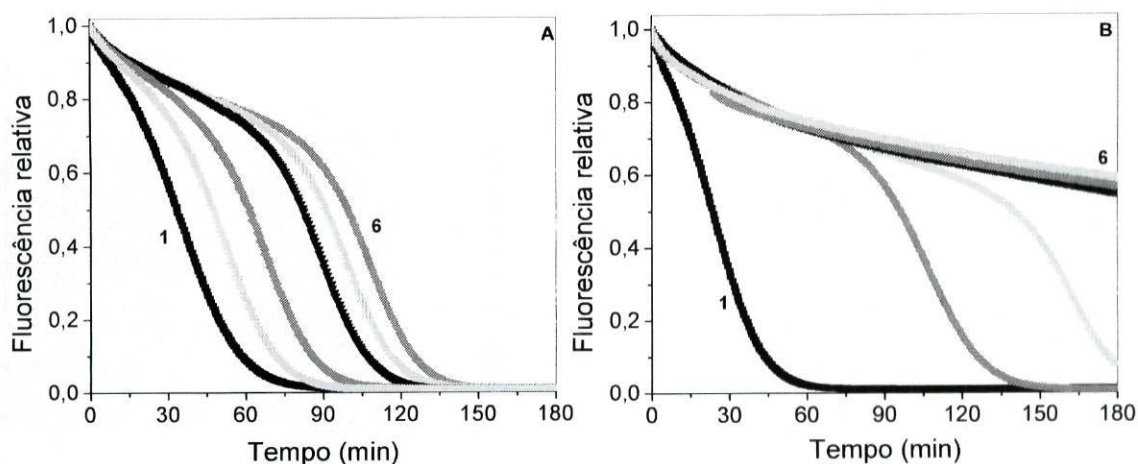


Figura 4.30: Fluorescência relativa observada durante a peroxidação de lipossomas unilamelares, com a sonda DPH-PA incorporada, induzida pelo AAPH (15 mM) a 37°C e perante a adição de diferentes concentrações dos antioxidantes de referência trolox (A: (1) 0; (2) 3; (3) 5; (4) 11; (5) 13; e (6) 15 μM) e vitamina E (B: (1) 0; (2) 1,5; (3) 4; (4) 8; (5) 11; e (6) 16 μM).

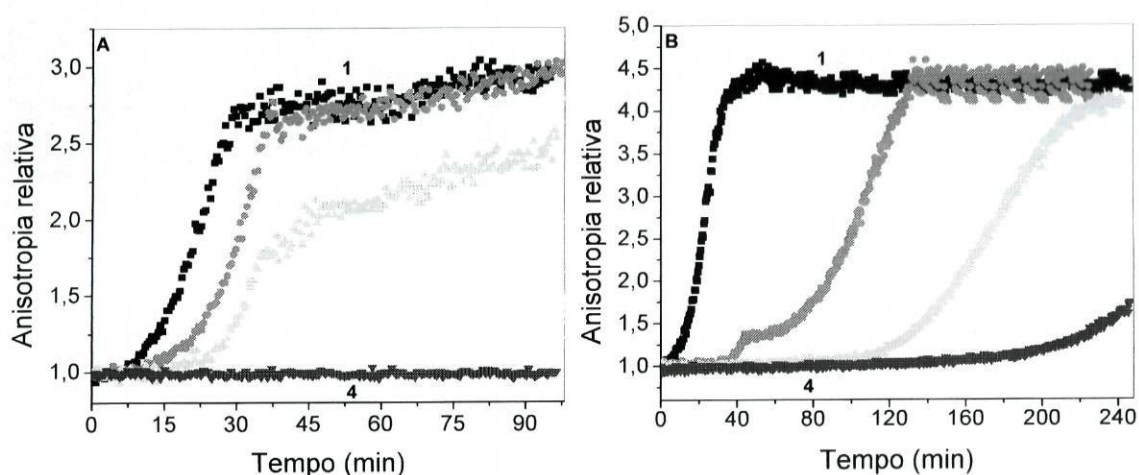


Figura 4.31: Anisotropia relativa observada durante a peroxidação de lipossomas unilamelares, com a sonda DPH-PA incorporada, induzida pelo AAPH (15 mM) a 37°C e perante a adição de diferentes concentrações dos antioxidantes de referência trolox (A: (1) 0; (2) 2; (3) 9; (4) 18 μM) e vitamina E (G: (1) 0; (2) 1,5; (3) 4; (4) 8 μM).

Nas Figuras 4.28 e 4.29 é possível observar que os anti-inflamatórios clonixina e indoprofeno foram os menos eficazes na inibição da peroxidação lipídica, quer pelas

determinações da intensidade de fluorescência, quer pelas determinações de anisotropia, independentemente das concentrações utilizadas, uma vez que, para todas as concentrações ensaiadas, o perfil obtido da diminuição da intensidade de fluorescência/aumento de anisotropia foi semelhante ao obtido para o controlo da peroxidação. Os restantes AINES, assim como os antioxidantes de referência utilizados (Figuras 4.30 e 4.31), mostraram ser capazes de proteger a sonda da oxidação pelos radicais peróxido, de um modo dependente da concentração, pelas determinações da intensidade de fluorescência e de anisotropia. Nas Figuras 4.28 a 4.31 é ainda possível observar que os AINES não inibem a peroxidação lipídica com o mesmo perfil do trolox ou da vitamina E, uma vez que, estes últimos, retardaram o decaimento da intensidade de fluorescência ou a subida dos valores de anisotropia, mas, ultrapassado um determinado período de tempo, atingiu-se quer o mínimo da intensidade de fluorescência, quer o máximo de rigidificação obtido no ensaio controlo de peroxidação. Pelo contrário, os AINES alteraram a cinética da peroxidação, que não se deu até aos valores máximos de anisotropia nem à perda total da intensidade de fluorescência obtidos nos ensaios apenas com o iniciador da peroxidação, mas houve uma estabilização desse efeito mais cedo do que o que ocorreu no ensaio controlo de peroxidação. Adicionalmente, pela observação das mesmas Figuras, pode-se verificar que o AINE que se mostrou mais eficaz na inibição da peroxidação lipídica foi o etodolac, quer pelas determinações de anisotropia, quer pelas determinações de fluorescência. Contudo, para melhor avaliar as diferenças de eficácia dos compostos estudados na inibição da peroxidação lipídica, determinaram-se os valores de IC_{50} respectivos a cada um dos AINES estudados e dos antioxidantes de referência, a partir das rectas de regressão obtidas nas representações gráficas da percentagem da razão $(AUC_{\text{AINE/Antioxidante de referência}} - AUC_{\text{AAPH}})/AUC_{\text{AAPH}}$ *versus* concentração de composto usada nos estudos de fluorescência e anisotropia (Figura 4.32). Os valores de IC_{50} calculados estão apresentados na Tabela 4.4.

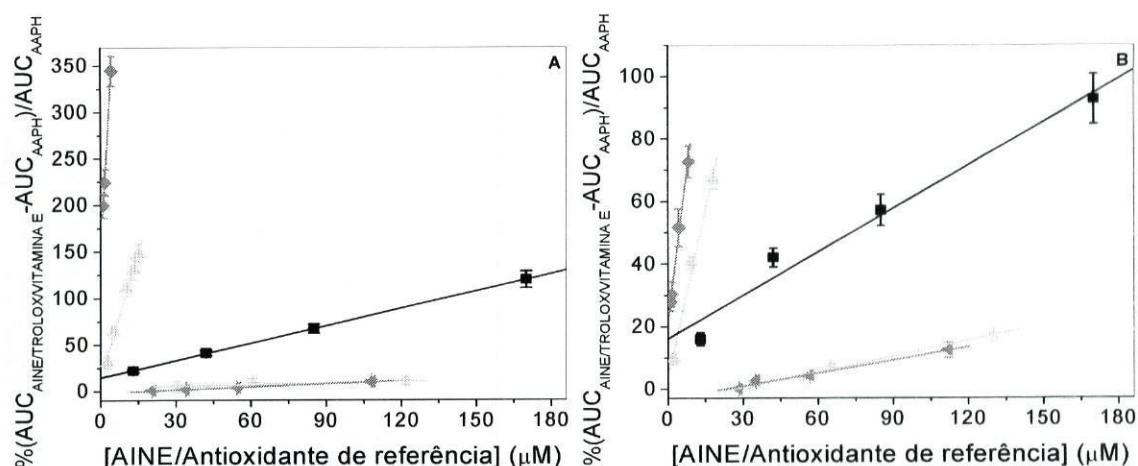


Figura 4.32: Regressão linear entre a percentagem da razão $(\text{AUC}_{\text{AINE/Trolox/Vitamina E}} - \text{AUC}_{\text{AAPH}}) / \text{AUC}_{\text{AAPH}}$ e as concentrações usadas de AINEs, trolox e vitamina E, obtidas no estudo de decaimento da intensidade de fluorescência (A) e aumento da anisotropia (B). (♦) tenoxicam; (◀) piroxicam; (■) etodolac; (▲) trolox; e (◆) vitamina E. Os valores da razão referida foram calculados a partir dos resultados de três experiências (média $\pm$ desvio padrão).

Tabela 4.4: Valores de IC_{50} ($\pm$ desvio padrão), dos AINEs estudados, do trolox e da vitamina E, obtidos em três ensaios independentes de fluorescência e anisotropia, para avaliação da actividade antioxidante pela sonda DPH-PA, a partir da equação das rectas de regressão das representações gráficas $\%(\text{AUC}_{\text{AINE/Trolox/Vitamina E}} - \text{AUC}_{\text{AAPH}}) / \text{AUC}_{\text{AAPH}}$ versus concentração dos respectivos compostos.

Compostos	DPH-PA (IC_{50})	
	Fluorescência	Anisotropia
Indoprofeno	— *	— *
Clonixina	— *	— *
Etodolac	$57,0 \pm 2,1$	$73,5 \pm 8,1$
Piroxicam	n.a. **	n.a. **
Tenoxicam	n.a. **	n.a. **
Trolox	$4,1 \pm 0,5$	$12,9 \pm 1,5$
Vitamina E	$0,4 \pm 0,1$	$4,4 \pm 0,1$

*sem actividade

** não atinge

Pela análise da Tabela 4.4 e da Figura 4.32, é possível verificar que a ordem de eficácia obtida para os compostos em estudo, nos estudos de fluorescência e de anisotropia, é a seguinte: vitamina E > trolox > etodolac > piroxicam ≥ tenoxicam. A vitamina E foi, de facto, mais eficaz na prevenção da peroxidação lipídica que o seu análogo hidrossolúvel, já que o trolox necessitou de uma concentração aproximadamente 10 vezes superior à da vitamina E para apresentar a mesma eficácia antioxidante. Relativamente aos AINEs estudados, verificou-se que, apesar dos oxicamos apresentarem um coeficiente de partição mais elevado, não apresentaram uma maior eficácia antioxidante. De facto, poder-se-ia supor que quanto maior fosse o coeficiente de partição de um composto, maior seria a sua concentração no interior da membrana e, conseqüentemente, maior seria a sua actividade antioxidante, uma vez que se encontrariam localizados na proximidade das moléculas alvo. No entanto, como é possível verificar na Tabela 4.4, os oxicamos mostraram-se menos eficazes que o etodolac na prevenção da peroxidação lipídica. A maior eficácia antioxidante apresentada pelo etodolac pode estar relacionada com o facto deste se poder encontrar localizado na proximidade da superfície polar membranar, pelo estabelecimento de interacções electrostáticas, ou livre na fase aquosa, e, deste modo, capturar os radicais peroxilo derivados do indicador AAPH a esses níveis, impedindo-os de penetrar para o interior da bicamada e iniciar a peroxidação lipídica. Estes resultados também estão de acordo com os obtidos nos estudos anteriores, em que o etodolac se revelava o mais eficaz na captura dos radicais peroxilo gerados na fase aquosa.

4.4.3.2. Radicais $ROO^{\bullet}$ gerados na fase lipídica

O objectivo deste estudo foi avaliar a actividade antioxidante dos AINEs, na peroxidação lipídica, quando os radicais peroxilo eram gerados por decomposição térmica do composto AMVN, no interior da bicamada lipídica. A proporção de oxidação foi medida quantitativamente pela diminuição da intensidade de fluorescência de sondas fluorescentes, na ausência e na presença dos diferentes compostos em estudo.

4.4.3.2.1. Avaliação da actividade antioxidante dos AINES usando a sonda DPH-PA

A monitorização da intensidade de fluorescência da sonda DPH-PA [24, 68] foi utilizada para estudar os efeitos dos AINES na peroxidação lipídica induzida pelo AMVN.

Para que fosse possível a realização deste estudo em condições optimizadas foi necessário determinar a concentração de AMVN mais adequada, o efeito da temperatura e a reprodutibilidade dos ensaios. Assim, foram testadas diferentes concentrações de AMVN (300, 500, 1000 e 1500 μM) para uma mesma concentração de EPC (correspondente à utilizada nos estudos com o AAPH), a diferentes valores de temperatura (37, 40 e 45°C), uma vez que este parâmetro influencia a velocidade de decomposição do composto azo [23]. Na Figura 4.33 é possível observar o decaimento da intensidade de fluorescência obtido para diferentes concentrações de AMVN a uma determinada temperatura, e a Figura 4.34 apresenta um exemplo do efeito provocado pela temperatura no decréscimo da intensidade de fluorescência para uma mesma concentração de AMVN.

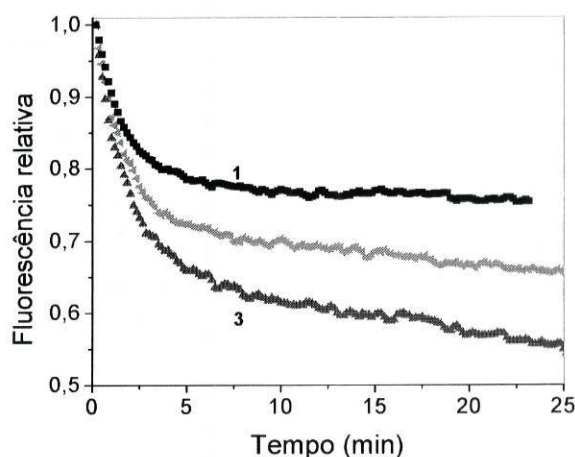


Figura 4.33: Fluorescência relativa observada durante a peroxidação de lipossomas unilamelares (800 μM) induzida por diferentes concentrações de AMVN: (1) 300; (2) 500; e (3) 1500 μM , a 45°C.

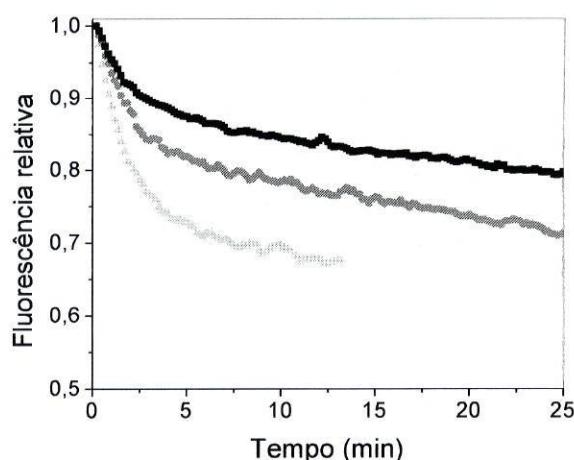


Figura 4.34: Fluorescência relativa observada durante a peroxidação de lipossomas unilamelares (800 μM) induzida por AMVN a diferentes valores de temperatura: (■) 37; (●) 40; e (▲) 45 $^{\circ}\text{C}$, para uma mesma concentração de AMVN (1000 μM).

A concentração de AMVN e a temperatura escolhidas, para a realização dos estudos de avaliação da actividade antioxidante dos AINEs, foi de 300 μM a 45 $^{\circ}\text{C}$. Estes dois parâmetros permitiram obter uma diminuição da intensidade de fluorescência mensurável, juntamente com o facto da actividade antioxidante dos fármacos poder ser mais facilmente visualizada com a concentração de AMVN utilizada, do que com concentrações superiores.

Após a selecção dos valores para os parâmetros descritos, houve necessidade de verificar se o ensaio era reprodutível, ou seja, se diferentes alíquotas de LUVs, incluindo a sonda DPH-PA e o AMVN, originavam iguais decaimentos da intensidade de fluorescência da sonda DPH-PA. Apesar deste procedimento já ter sido anteriormente executado para todas as concentrações de AMVN testadas, houve necessidade de, mais uma vez, verificar a reprodutibilidade num intervalo de tempo superior. Na Figura 4.35 é possível observar o decaimento da intensidade de fluorescência obtido para várias alíquotas de uma mesma suspensão lipídica retiradas a diferentes intervalos de tempo (2 ou mais horas).

Além da reprodutibilidade obtida a partir de uma mesma suspensão lipídica (Figura 4.35), houve também necessidade de analisar se essa propriedade era extensível às alíquotas retiradas de diferentes suspensões lipídicas (Figura 4.36). Como pode ser observado na Figura 4.36, a diferença no decréscimo da intensidade de fluorescência entre alíquotas retiradas de suspensões lipídicas distintas não era significativa. Portanto, estavam reunidas as condições experimentais necessárias para

a realização do estudo da actividade antioxidante dos AINEs, usando a sonda DPH-PA, na peroxidação lipídica induzida pelos radicais peróxido gerados no interior da bicamada lipídica.

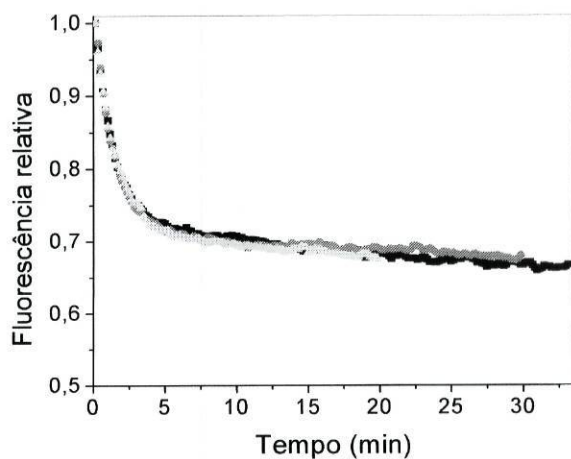


Figura 4.35: Fluorescência relativa observada durante a peroxidação de diferentes alíquotas de LUVs (800 µM) com o indutor AMVN (300 µM) incorporado, retiradas de uma mesma suspensão lipídica, a 45°C.

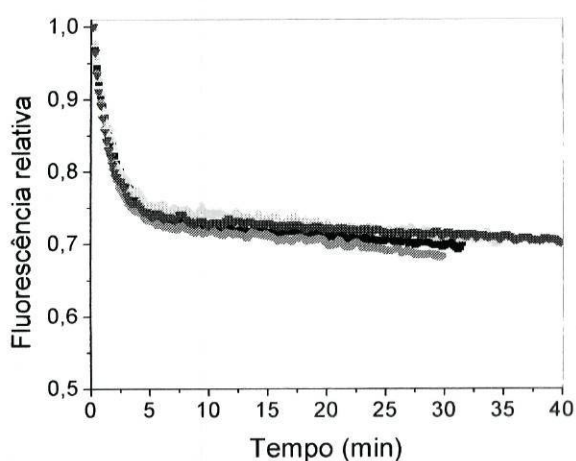


Figura 4.36: Fluorescência relativa observada durante a peroxidação de alíquotas de lipossomas unilamelares (800 µM) retiradas de diferentes suspensões lipídica, induzida por AMVN (300 µM), a 45°C.

Nestes estudos, ao contrário dos realizados com o AAPH, foi possível a determinação da actividade antioxidante do AINE diclofenac face aos radicais peroxilo, pois não ocorria a formação de um precipitado após a adição do fármaco ao meio reaccional. Contudo, para garantir que essa precipitação não ocorria, preparou-se uma solução concentrada de diclofenac em etanol que foi adicionada a uma solução também concentrada de AMVN. Uma vez que não se observou a formação de um precipitado, aquando da junção dos dois reagentes, este procedimento permitiu assegurar que era possível a avaliação da actividade antioxidante do diclofenac na peroxidação lipídica induzida pelo AMVN.

Os ensaios controlo efectuados neste estudo para a sonda, AINEs e antioxidantes de referência foram em tudo semelhantes aos ensaios controlo efectuados com a sonda DPH-PA nos estudos com o iniciador hidrossolúvel AAPH, excepto a temperatura do ensaio. Assim, para garantir que este pequeno aumento de temperatura (37 para 45°C) não afectava a intensidade de fluorescência da sonda utilizada, durante o período de tempo necessário à realização do ensaio, houve necessidade de os repetir. Os resultados obtidos mostraram que neste ensaio, assim como no estudo com o AAPH, os valores da intensidade de fluorescência eram muito estáveis durante todo o decurso do ensaio, enquanto que no ensaio controlo de peroxidação ocorria uma diminuição significativa da intensidade de fluorescência.

Nas Figuras 4.37 e 4.38 é possível observar as representações gráficas da fluorescência relativa da sonda DPH-PA em função do tempo, obtidas na presença de concentrações crescentes de composto e do iniciador da peroxidação lipídica AMVN. Deste modo, pela análise das Figuras 4.37 e 4.38, pode-se verificar se os antioxidantes de referência ou os AINEs em estudo apresentaram ou não actividade antioxidante nas condições experimentais estabelecidas, através da comparação do decaimento da intensidade de fluorescência da sonda DPH-PA na presença de diferentes concentrações de composto, com o obtido no controlo de peroxidação, ou seja, sem a adição do composto em estudo ao meio reaccional.

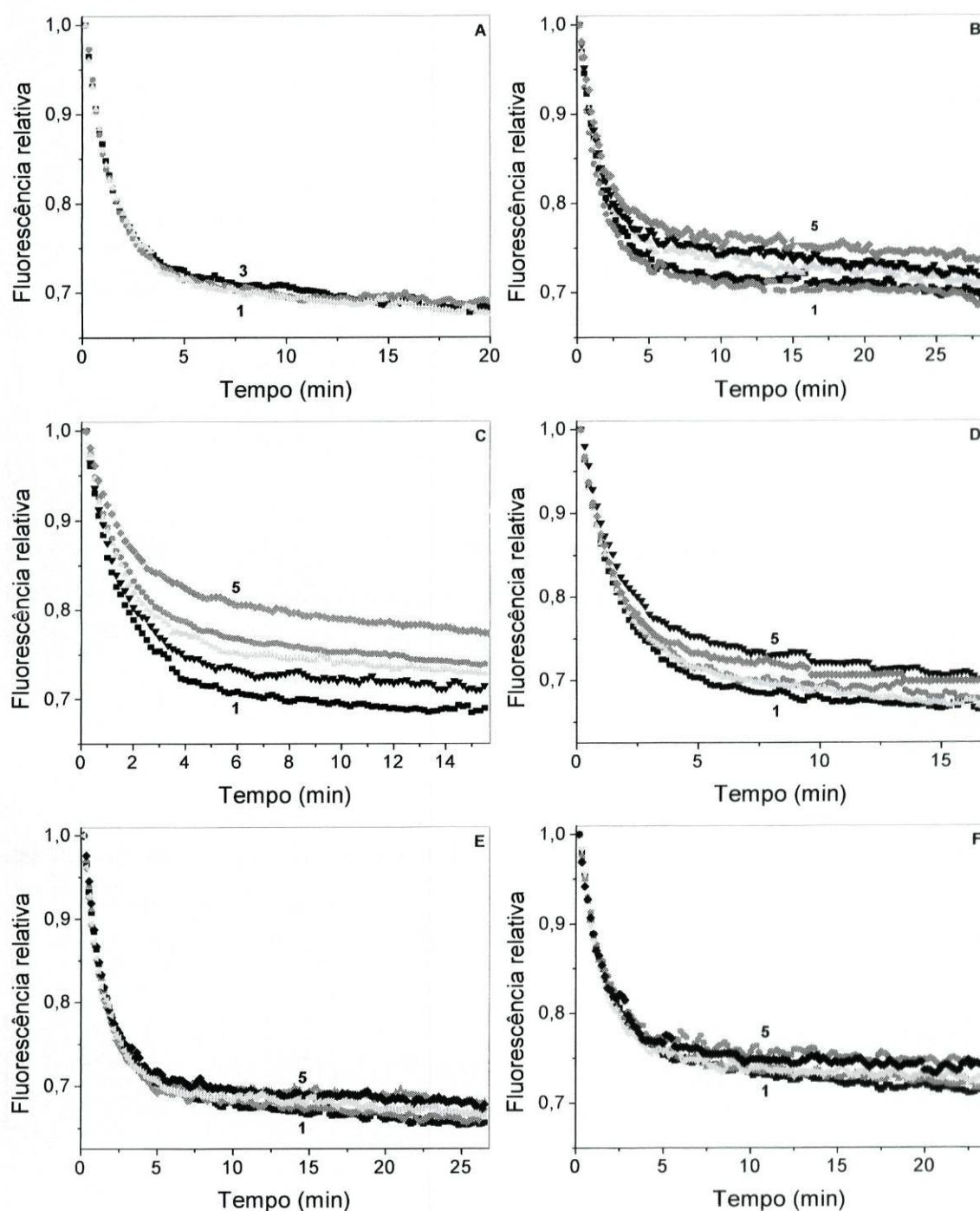


Figura 4.37: Fluorescência relativa observada durante a peroxidação lipídica, induzida pelo AMVN (300 μM) incorporado em lipossomas unilamelares, a 45°C, na presença de diferentes concentrações dos AINEs indoprofeno (A: (1) 0; (2) 178; e (3) 356 μM), clonixina (B: (1) 0; (2) 56; (3) 111; (4) 222; e (5) 444 μM), tenoxicam (C: (1) 0; (2) 56; (3) 111; (4) 161; e (5) 222 μM), piroxicam (D: (1) 0; (2) 55; (3) 111; (4) 158; e (5) 210 μM), etodolac (E: (1) 0; (2) 111; (3) 160; (4) 254; e (5) 356 μM) e diclofenac (F: (1) 0; (2) 222; (3) 306; (4) 361; e (5) 444 μM).

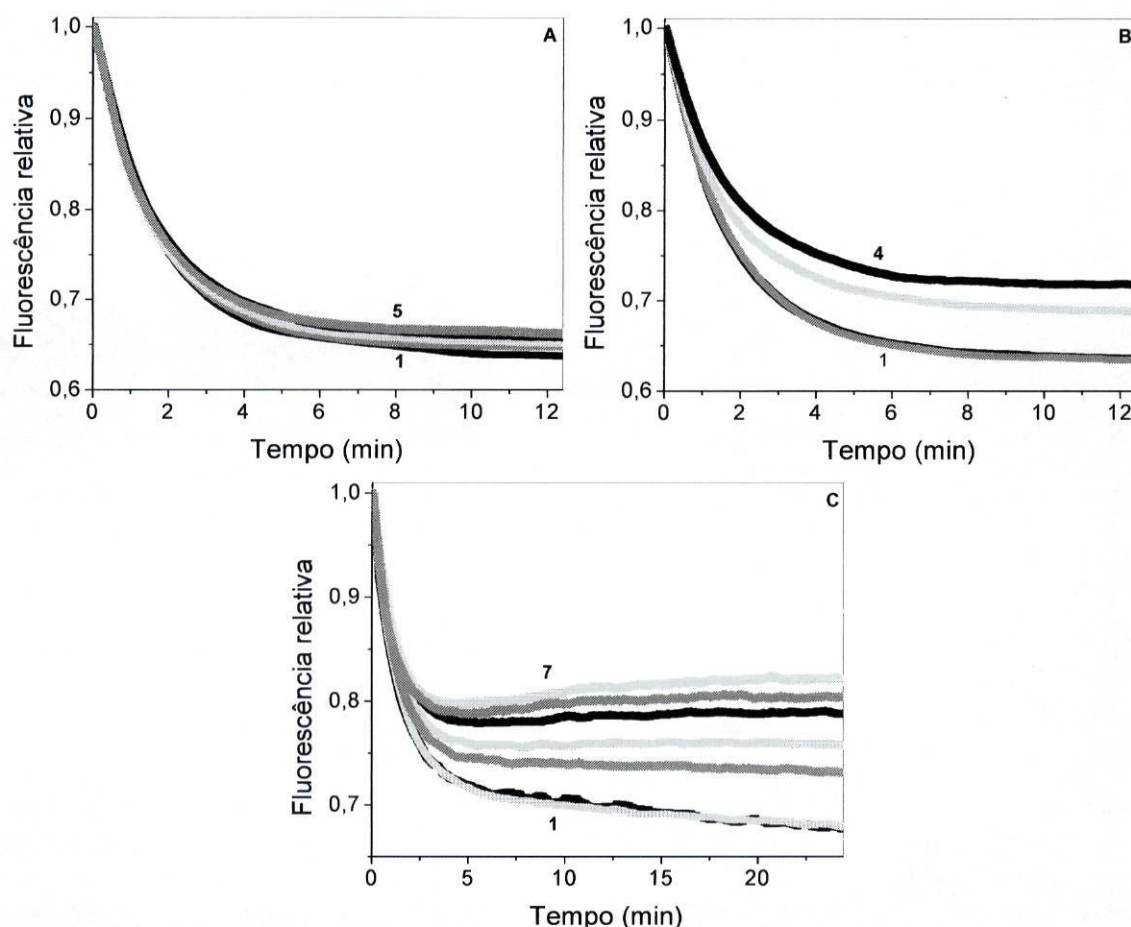


Figura 4.38: Fluorescência relativa observada durante a peroxidação lipídica, induzida pelo AMVN (300 μ M) incorporado em lipossomas unilamelares, a 45°C, na presença de diferentes concentrações dos antioxidantes de referência trolox (A: (1) 0; (2) 56; (3) 111; (4) 222; e (5) 444 μ M), vitamina E (B: (1) 0; (2) 174; (3) 333; e (4) 444 μ M) e galhato de laurilo (C: (1) 0; (2) 0 (etanol 1,1%); (3) 14; (4) 28; (5) 56; (6) 84; e (7) 112 μ M).

As Figuras 4.37 e 4.38 permitem verificar que os AINEs em estudo, com excepção do indoprofeno, assim como os antioxidantes de referência utilizados, mostraram ser capazes de proteger a sonda DPH-PA da oxidação pelos radicais peróxido gerados no interior da fase lipídica, de um modo dependente da concentração. Adicionalmente, é possível observar que alguns compostos apenas se mostraram eficazes na inibição da peroxidação lipídica acima de um determinado valor de concentração. Por exemplo, nas concentrações ensaiadas, o AINE etodolac só apresentou alguma actividade antioxidante para valores de concentração iguais ou superiores a 160 μ M, enquanto que para a vitamina E e para o diclofenac foram necessárias concentrações iguais ou superiores a 222 μ M para se verificar protecção da sonda DPH-PA relativamente aos radicais peróxido gerados pelo AMVN.

É ainda possível observar, nos exemplos mostrados nas Figura 4.37 e 4.38, que a inibição da peroxidação lipídica pelos AINES e pelos antioxidantes de referência pode ser visualizada pela estabilização da intensidade de fluorescência a valores superiores aos obtidos no ensaio controlo de peroxidação. Este perfil também já se tinha verificado para os anti-inflamatórios no estudo da avaliação da peroxidação lipídica pela sonda DPH-PA na presença do indutor AAPH.

Apesar da observação das Figuras 4.37 e 4.38 permitir comparar a actividade antioxidante obtida para cada composto, para melhor se avaliar as diferenças de eficácia dos mesmos na inibição da peroxidação lipídica pelos radicais peroxilo, determinaram-se os valores de IC_5 (concentração de cada composto requerida para que a razão referida apresente um valor de 5%), a partir das rectas de regressão obtidas na representação gráfica da percentagem da razão $(AUC_{\text{AINE/Antioxidante de referência}} - AUC_{\text{AMVN}})/AUC_{\text{AMVN}}$ versus concentração de composto (Figura 4.39). Os valores de IC_5 , assim calculados, estão presentes na Tabela 4.5.

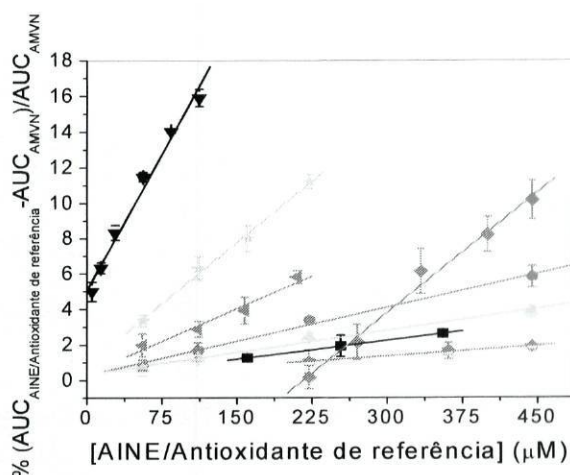


Figura 4.39: Regressão linear entre a percentagem da razão $(AUC_{\text{AINE/Antioxidante de referência}} - AUC_{\text{AMVN}})/AUC_{\text{AMVN}}$ e as concentrações usadas de AINES, trolox, vitamina E e galhato de laurilo. (●) clonixina; (★) tenoxicam; (▼) piroxicam; (■) etodolac; (○) diclofenac; (▲) trolox; (◆) vitamina E; e (▼) galhato de laurilo. Os valores da razão referida foram calculados a partir dos resultados de três experiências (média $\pm$ desvio padrão).

Tabela 4.5: Valores de IC_5 ($\pm$ desvio padrão), do trolox, da vitamina E, do galhato de laurilo e dos AINEs estudados, obtidos nos ensaios de fluorescência para avaliação da actividade antioxidante, pela sonda DPH-PA, a partir da equação das rectas de regressão das representações gráficas $\%(AUC_{AINE/Antioxidante\ de\ referência} - AUC_{AMVN})/AUC_{AMVN}$ versus concentração dos respectivos compostos.

Compostos	DPH-PA (IC_5)
Diclofenac	n.a.*
Indoprofeno	_____**
Clonixina	$370,6 \pm 5,3$
Etodolac	n.a.*
Piroxicam	$189,1 \pm 7,0$
Tenoxicam	$89,5 \pm 1,6$
Trolox	n.a.*
Vitamina E	$271,6 \pm 5,9$
Galhato de Laurilo	$5,0 \pm 0,8$

* não atinge

**sem actividade

Pela análise da Figura 4.39 e da Tabela 4.5, é possível ordenar os compostos, em termos de eficácia, do seguinte modo: galhato de laurilo > tenoxicam > piroxicam > vitamina E > clonixina > trolox > etodolac > diclofenac. Contudo, se além da Figura 4.39 e da Tabela 4.5 se tiver em conta os valores de concentração a partir dos quais se começou a observar actividade antioxidante, a ordem de eficácia obtida para os compostos, para um determinado valor de concentração inferior ao necessário para se observar inibição da peroxidação lipídica, passa a ser a seguinte: galhato de laurilo > tenoxicam > piroxicam > clonixina > trolox > etodolac > vitamina E > diclofenac. De facto, apesar da vitamina E, por exemplo, apresentar um valor de IC_5 inferior ao da clonixina, este antioxidante de referência só apresenta actividade antioxidante quando presente numa concentração igual ou superior a $222\ \mu M$, que corresponde ao dobro da concentração necessária de clonixina para se observar inibição da peroxidação lipídica.

Os resultados obtidos podem ser explicados pela estrutura química do antioxidante associada à sua capacidade para interactuar e penetrar na bicamada lipídica. De facto, como já foi mencionado, o conhecimento da localização dos

fármacos na membrana, assim como a sua capacidade de perturbar a fluidez da mesma, parecem ser factores importantes para a eficácia antioxidante apresentada pelos diferentes compostos. Deste modo, a capacidade de captura dos radicais por um determinado composto depende da sua estrutura química, mas pode também ser promovida pela sua concentração na vizinhança do lípido susceptível de oxidação e pela sua eficiência em aumentar a fluidez da membrana (opõe-se à rigidez resultante das membranas peroxidadas).

O galhato de laurilo foi utilizado como um composto de referência, uma vez que a actividade antioxidante e o mecanismo de acção dos compostos fenólicos face aos radicais peroxilo são bem conhecidos [18, 24, 30, 31]. Adicionalmente, a escolha deste composto fenólico em particular esteve relacionada com a sua lipossolubilidade, uma vez que os radicais peroxilo eram gerados no interior da bicamada lipídica. A utilização do galhato de laurilo foi necessária, pois os antioxidantes de referência usualmente usados (trolox e vitamina E) não se mostraram muito eficazes na inibição da peroxidação lipídica quando usados em baixas concentrações.

A menor actividade antioxidante obtida para os antioxidantes de referência, trolox e vitamina E, face aos radicais peroxilo gerados no interior da bicamada lipídica, quando comparada com a eficácia antioxidante para os mesmos radicais, mas gerados na fase aquosa, pode ser explicada, fundamentalmente, a partir da posição e orientação destes compostos relativamente à membrana lipídica. O antioxidante hidrossolúvel trolox, como já anteriormente referido, deve exercer a sua actividade antioxidante perto ou na região superficial da membrana. Este postulado tem como base os resultados obtidos, assim como certas observações experimentais descritas na literatura [17]. Por exemplo, é sabido que os radicais peroxilo são altamente polarizados [17, 69, 70] e, como consequência, é de esperar que tais radicais formados inicialmente na região hidrofóbica das membranas se difundam rapidamente para a região polar, próxima da fase aquosa, onde um antioxidante hidrossolúvel os possa inactivar. Adicionalmente, outros estudos demonstraram que o trolox encontra-se sobretudo na fase aquosa e numa percentagem consideravelmente menor na fase lipídica de um sistema membranar fosfolipídico (aproximadamente 20% de partição) [17]. Esta observação, assim como a anterior, são compatíveis com o mecanismo de “difusão para captura” (“diffusion-trapping mechanism”), de acordo com o qual, a captura dos radicais peroxilo ocorre na ou próxima da região polar. Assim, os aspectos referidos sustentam o facto de que a acção antioxidante se deverá exercer num local próximo da superfície polar, ilustrado esquematicamente na Figura 4.40.

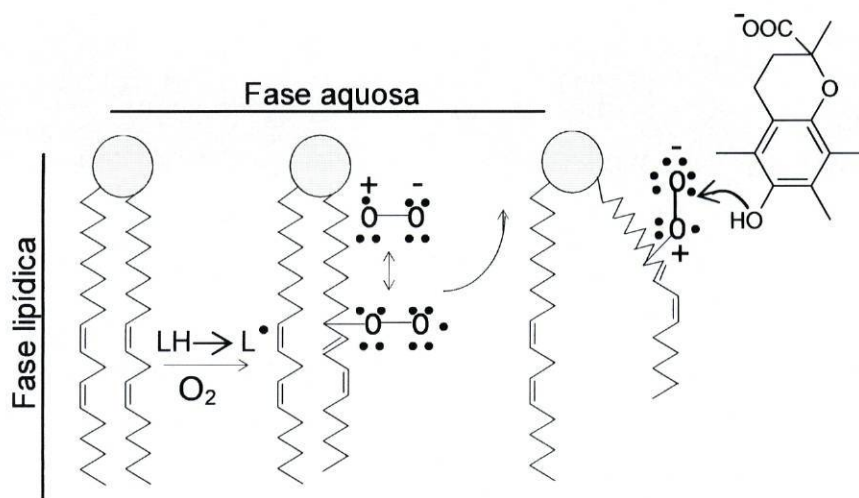


Figura 4.40: Representação esquemática da difusão de um radical peróxido, do interior da fase lipídica para a região polar da membrana e a sua captura pelo antioxidante hidrossolúvel trolox (adaptada de [17]). A parte polar da membrana é dipolar e o trolox apresenta carga negativa nas condições do ensaio.

O esquema presente na Figura 4.40 mostra a difusão dos radicais peróxido para a região polar da membrana e a sua captura pelo trolox, o qual pode difundir na bicamada o suficiente para entrar em contacto com esses radicais [17]. Contudo, como a partilha do trolox na fase lipídica não ocorre em grande extensão, encontrando-se, assim, maioritariamente na fase aquosa, tornam-se compreensíveis os resultados obtidos para este composto. Estes resultados estão de acordo com os obtidos para outros antioxidantes hidrossolúveis, como a vitamina C [71], a cisteína [72] e a glutathiona [73], os quais também não se apresentam como antioxidantes eficazes quando a reacção de oxidação é iniciada na fase lipídica das bicamadas.

A menor eficácia da vitamina E face aos radicais peróxido gerados no interior da membrana pode também ser explicada pela sua localização e orientação no interior dos lipossomas, e, adicionalmente, pela estabilização da membrana que esta vitamina origina. Esta vitamina lipossolúvel (a vitamina E é classificada como uma vitamina lipossolúvel, mas, devido à presença de um grupo hidroxilo ligado à estrutura em anel apresenta um carácter fracamente anfipático) é formada por um grupo cromanol, que constitui a parte polar e por uma cadeia fitol. A parte cromanol do α -tocoferol está orientada em direcção à interface lípido-água da bicamada fosfolipídica, mas não se estende para dentro dessa interface, enquanto que a cadeia hidrofóbica se encontra

localizada paralelamente às cadeias hidrocarbonadas dos fosfolípidos [40, 74, 75] (Figura 4.41).

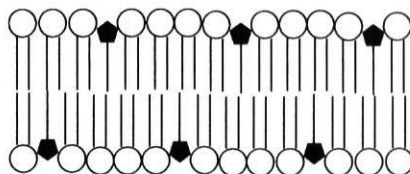


Figura 4.41: Representação esquemática da localização da vitamina E no interior da membrana. ○ e ● representam as moléculas de fosfatidilcolina e vitamina E, respectivamente.

A parte polar da vitamina E é a responsável pela captura dos radicais livres, enquanto que a cadeia hidrofóbica ancora firmemente a molécula no interior da bicamada fosfolipídica [40, 74, 75]. Neste contexto, os radicais livres gerados pelo AMVN, no meio lipídico, estarão em contacto com a cadeia fitol e, consequentemente, mais afastados do grupo cromanol, o qual é essencial para o processo de captura (pelo contrário o grupo cromanol na superfície será óptimo para a protecção da peroxidação lipídica provocada pelos radicais gerados na fase aquosa, como se verificou nos estudos efectuados com o AAPH). Por outro lado, a capacidade da vitamina E em estabilizar a membrana, pela formação de complexos com produtos membranares resultantes da hidrólise lipídica, como ácidos gordos livres [74, 75], pode também contribuir para a sua menor actividade antioxidante quando os radicais peroxilo são gerados pelo AMVN. Com efeito, a diminuição da fluidez membranar vai dificultar a difusão dos radicais peroxilo em direcção à parte polar da membrana, o que dificulta o contacto entre a parte da vitamina E responsável pela captura dos radicais com os radicais $\text{ROO}^\bullet$.

Relativamente aos AINEs estudados, enquanto que o indoprofeno não mostrou capacidade antioxidante, fundamentalmente justificada pela incapacidade deste AINE partilhar com a membrana (corroborado pelos estudos de determinação do valor de K_p e de localização), todos os outros fármacos mostraram actividade antioxidante em maior ou menor extensão. Destes, o diclofenac foi o que se revelou menos eficaz na inibição da propagação da peroxidação lipídica. Esta menor eficácia, relativamente aos outros AINEs, pode ser explicada pelas alterações provocadas pelo diclofenac na fluidez membranar. De facto, o AINE referido provoca um enrijecimento da membrana,

enquanto os restantes a fluidificam [76, 77]. Esta diminuição da fluidez membranar adicionada à resultante da peroxidação lipídica, como já referido para a vitamina E, faz com que a interacção das moléculas do fármaco com os radicais lipídicos não seja tão eficiente. Com efeito, vários autores demonstraram que os compostos interaccionam mais eficientemente com os radicais lipídicos quando a membrana se encontra num estado mais fluido [18, 30, 31].

A ausência de actividade antioxidante do etodolac, para as concentrações testadas inferiores a 160 μM , pode ser justificada pela inexistência de fármaco na proximidade das moléculas de lípido susceptível à oxidação, uma vez que não partilharia nessas condições (o que é corroborado pelos estudos de determinação do valor de K_p e de localização). Deste modo, valores de concentração iguais ou superiores ao apresentado, mostraram alguma capacidade em diminuir o decaimento da intensidade de fluorescência, devido à presença de moléculas de fármaco no interior da membrana lipídica, as quais também apresentam capacidade de fluidificar a membrana.

A diferença de eficácia observada entre os oxicamos e a clonixina pode ser justificada pela menor concentração deste último AINE na proximidade dos lípidos susceptíveis de oxidação associado ao menor efeito fluidificante da membrana, comparativamente ao tenoxicam e piroxicam (os oxicamos necessitam de concentrações inferiores para provocar a mesma percentagem de fluidificação e possuem valores de coeficiente de partição aproximadamente quatro vezes superior ao da clonixina, como se encontra descrito no capítulo 3), além da estrutura química, uma vez que a presença dos grupos captadores de electrões $-\text{COOH}$ e $-\text{Cl}$ directamente ligados aos anéis aromáticos da clonixina pode, adicionalmente, explicar a menor actividade antioxidante obtida.

Dos oxicamos estudados, o tenoxicam foi o que se mostrou mais eficaz na inibição da propagação da peroxidação lipídica. De facto, como é possível verificar no capítulo 3, foi dos AINEs estudados o que modificava em maior extensão a fluidez membranar, a qual constitui, como já mencionado, um importante factor para a actividade antioxidante demonstrada pelos compostos em geral. Assim, poder-se-á referir que de facto deve existir uma relação entre a actividade antioxidante e os efeitos de determinado composto na microviscosidade interna das membranas.

4.4.3.2.2. Avaliação da actividade antioxidante dos AINES usando as sondas fluoresceína e HDAF

Os radicais peroxilo, gerados por diferentes concentrações de AMVN no interior da membrana lipídica, não se mostraram capazes de oxidar as sondas fluoresceína e HDAF, uma vez que os valores de intensidade de fluorescência obtidos foram muito constantes em todo o decurso do ensaio (Figuras 4.42 e 4.43). Com efeito, como é possível observar nas Figura 4.42 e 4.43, o perfil obtido na presença de concentrações crescentes de AMVN é semelhante ao obtido para o controlo.

A constância observada para a intensidade de fluorescência deve estar relacionada, provavelmente, com a localização dos grupos susceptíveis de oxidação das sondas fluorescentes utilizadas relativamente à membrana (ao nível da superfície polar dos lipossomas para a sonda HDAF e na fase aquosa para a sonda fluoresceína). Assim, não foi possível a avaliação da actividade antioxidante dos fármacos em estudo ao nível da superfície polar das membranas e na fase aquosa, respectivamente, pelas sondas HDAF e fluoresceína, quando os radicais ROO[•] eram gerados na fase lipídica por decomposição térmica do AMVN.

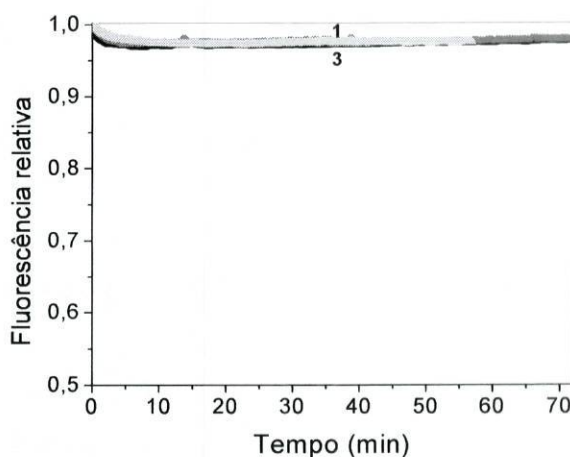


Figura 4.42: Comparação da fluorescência relativa observada durante o ensaio de oxidação da sonda fluoresceína pelo iniciador AMVN ((1) 500 e (2) 1500 µM) incorporado em lipossomas unilamelares de EPC, com a fluorescência relativa obtida no ensaio controlo para a sonda fluoresceína (3), a 45°C.

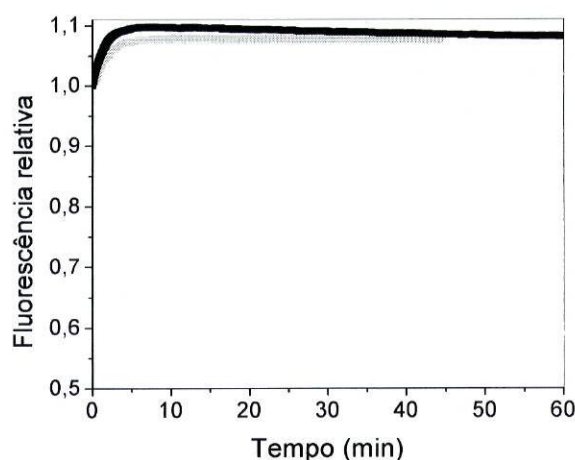


Figura 4.43: Fluorescência relativa observada durante o ensaio de oxidação induzida pelo AMVN ((●) 500 e (■) 1500 µM) incorporado em lipossomas unilamelares de EPC "marcados" com a sonda HDAF, a 45°C.

4.4.4. Avaliação da actividade antioxidante dos AINEs face aos radicais HO[•]

Os ensaios controlo para a sonda DPH-PA, AINEs e trolox foram em tudo semelhantes aos ensaios controlo efectuados com a sonda DPH-PA nos estudos com o iniciador hidrossolúvel AAPH. Assim, também nesta metodologia não se observou um decréscimo da intensidade de fluorescência significativo, quando comparado com o obtido no ensaio controlo de peroxidação (na ausência de fármaco e na presença do sistema indutor Fe²⁺/H₂O₂).

A presença simultânea dos AINEs ou do trolox e do sistema Fe²⁺/H₂O₂, no meio reaccional, permitiu verificar se os compostos em estudo apresentaram ou não actividade antioxidante, nas condições experimentais estabelecidas. Com efeito, através da comparação do decaimento da intensidade de fluorescência da sonda DPH-PA na presença de diferentes concentrações de fármaco ou trolox com o obtido no controlo de peroxidação, ou seja, sem a adição do composto em estudo ao meio reaccional, é possível verificar a eficácia antioxidante dos compostos. As Figuras 4.44 e 4.45 apresentam o comportamento obtido para os AINEs e para o antioxidante de referência em estudo durante a peroxidação de lipossomas unilamelares, induzida pelos radicais hidroxilo gerados pelo sistema Fe²⁺/H₂O₂.

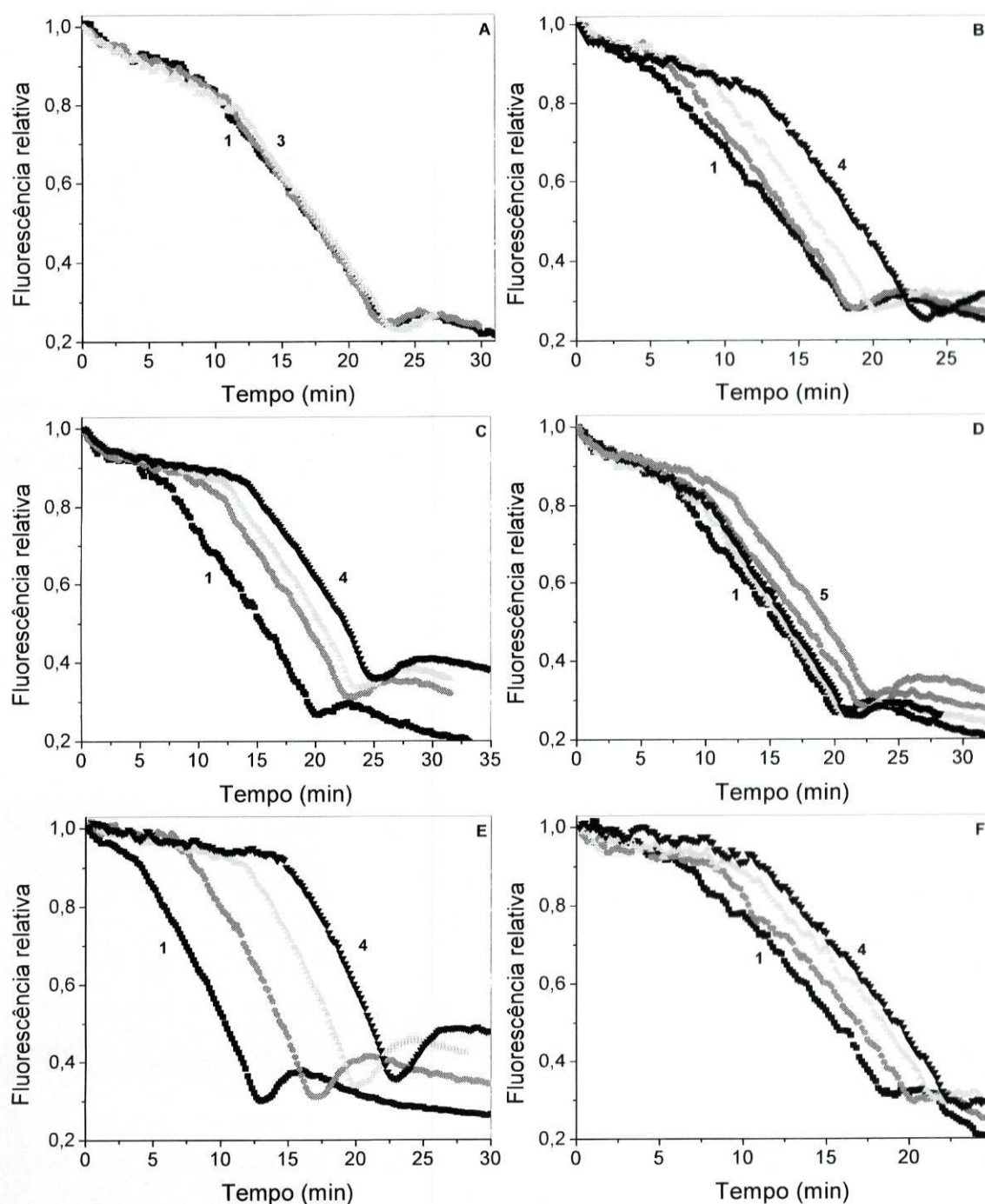


Figura 4.44: Fluorescência relativa observada durante a peroxidação de lipossomas unilamelares, com a sonda DPH-PA incorporada, induzida pelos radicais $\text{HO}^\bullet$ gerados pelo sistema oxidativo $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ (0,4/4 mM), a 37°C , na presença de diferentes concentrações dos AINES indoprofeno (A: (1) 0; (2) 95; e (3) 189 μM), clonixina (B: (1) 0; (2) 56; (3) 111; e (4) 222 μM), tenoxicam (C: (1) 0; (2) 28; (3) 57; e (4) 114 μM), piroxicam (D: (1) 0; (2) 12; (3) 25; (4) 50; e (5) 99 μM), etodolac (E: (1) 0; (2) 56; (3) 111; e (4) 222 μM) e diclofenac (F: (1) 0; (2) 56; (3) 111; e (4) 222 μM).

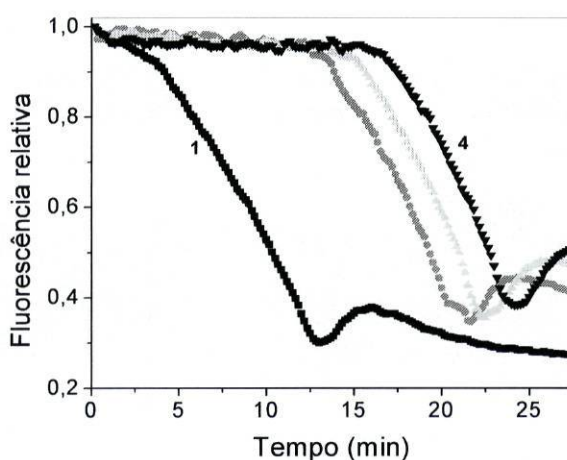


Figura 4.45: Fluorescência relativa observada durante a peroxidação de lipossomas unilamelares, com a sonda DPH-PA incorporada, induzida pelo sistema oxidativo $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ (0,4/4 mM), a 37° C, na presença de diferentes concentrações do antioxidante de referência, trolox ((1) 0; (2) 4,5; (3) 9; e (4) 18 μM).

É possível observar, nas Figuras 4.44 e 4.45, que os AINEs estudados, com excepção do indoprofeno, assim como o trolox apresentaram actividade antioxidante dependente da concentração, visível pelo retardar do decaimento da intensidade de fluorescência, com a formação de um patamar, comparativamente ao ensaio controlo de peroxidação. Adicionalmente, também se pode verificar que após se ter atingido o valor mínimo da intensidade de fluorescência houve um aumento dessa. No entanto, para o cálculo da área sob a curva, apenas se considerou o perfil obtido correspondente ao decaimento máximo da intensidade de fluorescência.

Tendo em conta que a área sob a curva, para um determinado ensaio experimental, era calculada para todas as amostras considerando o mesmo tempo de reacção, apenas se considerou, neste estudo, o tempo necessário para o controlo de peroxidação atingir o valor mínimo de fluorescência. Contudo, este procedimento não era viável para os compostos que apresentassem um patamar de inibição de peroxidação superior ao tempo necessário para se atingir o decaimento máximo da intensidade de fluorescência no controlo de peroxidação, pois obtinham-se valores de AUC muito semelhantes para as diferentes concentrações. Por este motivo, e uma vez que não se obteve um erro considerável entre linearizar as curvas obtidas após se atingir o valor mínimo da intensidade de fluorescência (cálculo 1), com o de se considerar apenas o tempo necessário para o controlo de peroxidação atingir esse valor (cálculo 2), utilizaram-se estes dois processos para determinar o valor de AUC. A Tabela 4.6 apresenta um exemplo dos valores da razão ($\text{AUC}_{\text{Clonixina}^-}$

$AUC_{Fe^{2+} H_2O_2}$)/ $AUC_{Fe^{2+} H_2O_2}$ obtidos para a clonixina e calculados pelas duas maneiras descritas.

Tabela 4.6: Valores da razão $(AUC_{Clonixina}-AUC_{Fe^{2+} H_2O_2})/AUC_{Fe^{2+} H_2O_2}$ determinados através dos cálculos 1 e 2, e obtidos num ensaio de fluorescência, através da monitorização da oxidação da sonda DPH-PA pelo radical $HO^\bullet$, na presença de diferentes concentrações de clonixina.

$(AUC_{Clonixina}-AUC_{Fe^{2+} H_2O_2})/AUC_{Fe^{2+} H_2O_2}$	
Cálculo 1	Cálculo 2
0,02488	0,02443
0,11546	0,11823
0,17719	0,17544

A representação gráfica da razão $(AUC_{AINE/trolox}-AUC_{Fe^{2+} H_2O_2})/AUC_{Fe^{2+} H_2O_2}$ ou da sua percentagem *versus* concentração dos fármacos e do trolox (Figura 4.46 A) permitiu uma melhor comparação dos compostos relativamente à sua eficácia antioxidante. Complementarmente, foram determinados os valores de IC_{15} (concentração de cada composto necessária para que a razão referida apresente um valor de 15%) através das regressões lineares obtidas no gráfico percentagem da razão $(AUC_{AINE/trolox}-AUC_{Fe^{2+} H_2O_2})/AUC_{Fe^{2+} H_2O_2}$ *versus* concentração dos compostos (Figura 4.46 B). Os valores de IC_{15} determinados estão apresentados na Tabela 4.7.

A comparação dos valores de IC_{15} , obtidos e apresentados na Tabela 4.7, permitiu ordenar os compostos em termos de eficácia do seguinte modo: trolox > etodolac > tenoxicam > piroxicam > diclofenac > clonixina. Esta ordem corresponde, basicamente, à ordem de eficácia obtida no ensaio de fluorescência, através da monitorização da oxidação da sonda DPH-PA pelo agente oxidante $ROO^\bullet$ gerado na fase aquosa, excepto para a clonixina que não tinha apresentado actividade antioxidante significativa nesse ensaio e para o diclofenac, para o qual não foi possível determinar a sua capacidade antioxidante no ensaio com o iniciador AAPH, pois ocorria a formação de um precipitado no meio reaccional.

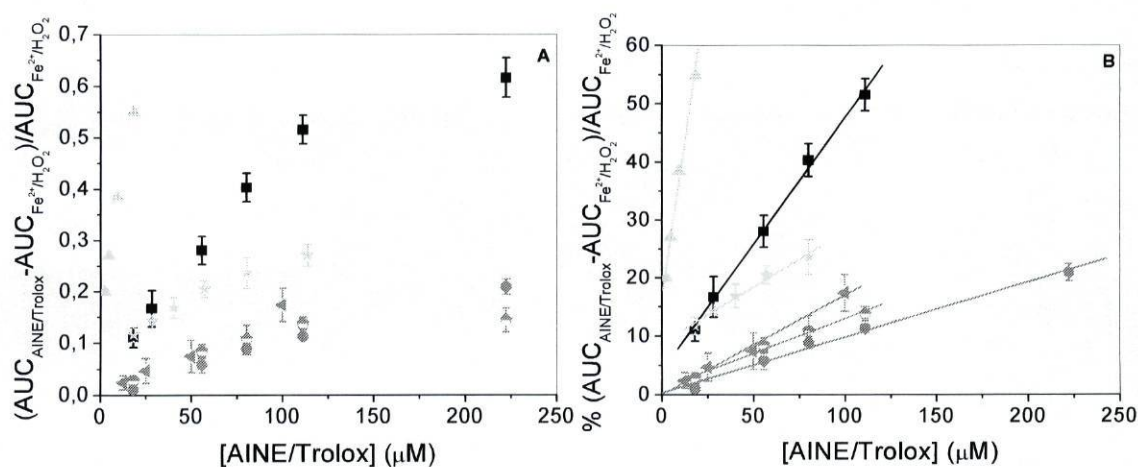


Figura 4.46 A: Representação gráfica da razão $(AUC_{AINE/Trolox} - AUC_{Fe^{2+}/H_2O_2}) / AUC_{Fe^{2+}/H_2O_2}$ versus concentração dos AINEs e trolox. B: Regressão linear entre a percentagem da razão $(AUC_{AINE/Trolox} - AUC_{AAPH}) / AUC_{AAPH}$ e as concentrações usadas de AINEs e trolox. (●) clonixina; (★) tenoxicam; (◄) piroxicam; (■) etodolac; (◐) diclofenac; e (▲) trolox. Os valores da razão referida foram calculados a partir dos resultados de três experiências (média $\pm$ desvio padrão).

Tabela 4.7: Valores de IC_{15} ($\pm$ desvio padrão), do trolox e dos AINEs estudados, obtidos nos ensaios de fluorescência para avaliação da actividade antioxidante, pela sonda DPH-PA, a partir da equação das rectas de regressão das representações gráficas $\% (AUC_{AINE/Antioxidante\ de\ referência} - AUC_{Fe^{2+}/H_2O_2}) / AUC_{Fe^{2+}/H_2O_2}$ versus concentração dos respectivos compostos.

Compostos	IC_{15}
Diclofenac	$117,3 \pm 18,6$
Indoprofeno	— *
Clonixina	$154,7 \pm 14,8$
Etodolac	$25,2 \pm 3,8$
Piroxicam	$88,3 \pm 15,4$
Tenoxicam	$32,3 \pm 8,0$
Trolox	$1,8 \pm 0,3$

*sem actividade

A actividade antioxidante demonstrada pela clonixina, face à peroxidação lipídica iniciada pelos radicais hidroxilo, pode ser justificada pelo facto destes radicais serem espécies oxidantes mais reactivas do que os radicais $ROO^{\bullet}$, reagindo

rapidamente com praticamente todas as moléculas vizinhas, como a clonixina, a partir do local da sua produção [3, 15] e por serem iniciadores menos eficazes da peroxidação lipídica, como já referido anteriormente. Deste modo, a capacidade da clonixina em penetrar e aumentar a fluidez membranar associada à sua actividade captadora pode ter um efeito mais pronunciado neste ensaio, relativamente ao anterior realizado na presença dos radicais peróxido.

4.5. CONCLUSÃO

O conjunto de resultados obtidos permitiu quantificar a capacidade antioxidante dos compostos testados face à peroxidação lipídica e à oxidação de biomoléculas de DNA, assim como contra radicais estáveis em solução. Contudo, os dados adquiridos em alguns dos estudos apresentaram diferenças significativas no que diz respeito à ordem de eficácia dos antioxidantes, nomeadamente em evitar os danos oxidativos na membrana. Deste modo, a ordem de eficácia obtida parece ser dependente dos procedimentos experimentais utilizados. De facto, tem sido descrito que a capacidade antioxidante, apresentada por uma amostra, depende da metodologia e dos geradores de radicais ou oxidantes que são usados nas medidas [30, 58]. Com efeito, cada um dos métodos utilizados analisou diferentes aspectos do mesmo processo, mas não fornece uma visão global de todo esse processo. Assim, houve necessidade de reunir várias metodologias para melhor estabelecer o mecanismo de acção de um antioxidante.

Um outro aspecto importante verificado nestes estudos foi o facto dos resultados obtidos para a reactividade de um antioxidante em solução homogénea não considerar os efeitos membranares, que poderiam aumentar ou diminuir a eficácia antioxidante, devido a vários factores que não são considerados nos testes químicos em solução vulgarmente difundidos. Deste modo, os resultados obtidos na presença de modelos membranares mostraram que a localização dos fármacos, assim como o local da geração dos radicais, afectava substancialmente a eficácia dos antioxidantes num sistema heterogéneo. Com efeito, os lipossomas, usados como modelos membranares, constituem ferramentas valiosas para este tipo de estudos, uma vez que, devido à sua composição e organização, conseguem mimetizar os processos que ocorrem nas membranas biológicas.

Pelo exposto se depreende a necessidade de avaliar a actividade antioxidante de um composto face a diversas espécies reactivas e preferencialmente na presença de modelos membranares, para uma melhor compreensão dos parâmetros farmacológicos apresentados pelo composto em questão.

Todos os AINEs testados se mostraram mais eficazes face aos radicais livres gerados na solução aquosa do que quando gerados no meio lipídico. Estes dados estão de acordo com o observado por outros autores [17, 23, 31, 40]. Os resultados obtidos no estudo da avaliação da actividade antioxidante dos AINEs na peroxidação lipídica quando os radicais peróxido eram gerados por decomposição térmica do composto AMVN, no interior da bicamada lipídica, sugeriram fortemente a existência de um sinergismo entre a capacidade intrínseca de captura dos AINEs e as modificações das propriedades físico-químicas da membrana, nomeadamente a fluidez. Os seus efeitos protectores contra os danos lipoperoxidativos estão, então, relacionados com a capacidade em doar um átomo de hidrogénio de um grupo doador presente na molécula e com a proporção da sua incorporação e orientação nas biomembranas. Assim, no estudo referido, a maior lipossolubilidade apresentada por um determinado composto, em adição à sua capacidade para fluidificar a membrana, representa uma mais valia na inibição da propagação da peroxidação lipídica, relativamente aos fármacos que não apresentavam essas características de um modo tão pronunciado. No entanto, nos estudos em que os radicais livres eram gerados na fase aquosa, essas propriedades não se mostraram tão importantes para a eficácia antioxidante demonstrada pelos compostos. De facto, por exemplo, o etodolac, que nos estudos com o indutor AMVN apresentou uma actividade antioxidante mínima, foi indubitavelmente o AINE com maior eficácia de captura face aos radicais livres gerados na fase aquosa. Provavelmente, o seu anel pirano desempenha a função central, visto que foi descrito que os derivados do pirano podem ser potentes captadores de ROS [42]. Contudo, a maior eficácia verificada para o etodolac está também relacionada com a sua localização relativamente à bicamada lipídica. Com efeito, a sua localização próxima da superfície membranar, devido à carga negativa apresentada ao valor de pH em estudo, facilitava a captura dos radicais aquosos [5]. Todavia, esta localização não deve permitir uma captura eficiente dos radicais no interior das membranas e, consequentemente, a menor actividade antioxidante observada quando os radicais eram gerados no interior da bicamada lipídica.

O facto da cinética de oxidação ser lenta em sistemas de EPC indicia que a reacção em cadeia não deva prosseguir por um longo período de tempo [5]. Por

consequente, o ataque inicial na membrana pelo radical aquoso representa um passo determinante e, portanto, os compostos que apresentem alguma hidrossolubilidade estão em vantagem relativamente aos totalmente lipossolúveis, que se encontram profundamente situados no interior da membrana lipídica. Assim, a prevenção do ataque inicial dos radicais aquosos na membrana fosfolipídica representa um papel essencial na defesa antioxidante das biomembranas, uma vez que estas são continuamente atacadas por radicais livres gerados na fase aquosa das fracções celular e subcelulares. Deste modo, a localização dos compostos, como por exemplo, etodolac, trolox e vitamina E (apesar da parte cromanol não se encontrar localizada na interface, estava orientada em direcção a essa interface lípido-água da bicamada lipídica) na interface permite uma melhor captura dos radicais e, por conseguinte, uma acção mais eficaz na inibição da peroxidação da membrana fosfolipídica. Mais uma vez se verifica que a posição e orientação dos compostos relativamente à membrana lipídica constitui um factor importante para a eficácia antioxidante demonstrada por esse determinado composto, o que só pode ser avaliado quando se efectuem os ensaios na presença de modelos membranares.

Os efeitos antioxidantes obtidos ocorreram em valores de concentrações relativamente altos, quando comparados com os presentes no plasma ou no líquido sinovial de humanos saudáveis recebendo estes fármacos em estudos pré-clínicos [78, 79]. Contudo, foi descrito que nos tecidos inflamados, alguns AINEs se acumulam originando, por exemplo, a nível do líquido sinovial, concentrações cerca de três a oito vezes mais altas do que em articulações sãs [80]. Além disso, outros factores existentes *in vivo*, como a longa exposição aos AINEs, pode diminuir a quantidade de ROS e, assim, menores concentrações de fármaco são requeridas relativamente às necessárias *in vitro* [81]. Com efeito, a capacidade de captura dos fármacos está directamente relacionada com a quantidade de espécies reactivas de oxigénio que são produzidas originando, assim, valores de IC diferentes [82]. Deste modo, é possível que concentrações mais baixas de AINEs apresentem actividade antioxidante *in vivo*, pois os níveis de ROS produzidos devem ser mais baixos *in vivo* do que os utilizados *in vitro*. De facto, por exemplo, já foi demonstrado que a indometacina é um eficaz antioxidante *in vivo*, apesar das altas concentrações necessárias *in vitro* [42, 83].

Os resultados obtidos, no estudo de avaliação da actividade antioxidante dos AINEs face a vários radicais, são importantes para a compreensão do mecanismo de acção destes fármacos, uma vez que fornecem evidências de que a actividade antioxidante destes fármacos poderá actuar em sinergia com os seus reconhecidos

efeitos de inibição da actividade das enzimas ciclooxigenase e lipoxigenase [8, 9], pela prevenção da propagação e da perpetuação dos danos oxidativos nos tecidos, nas reacções inflamatórias agudas e crónicas, *in vivo*. Com efeito, tem sido referido que a peroxidação causa ou aumenta as doenças inflamatórias, tais como a artrite reumatóide [19]. Assim, a inexistência de actividade antioxidante apresentada por um AINE pode constituir uma desvantagem, pois a acumulação dos radicais livres produzidos durante o processo inflamatório podem provocar efeitos deletérios nos tecidos circundantes. Adicionalmente, as ilações obtidas nos vários estudos realizados permitiram, de um modo geral, estabelecer uma relação causa-efeito entre a eficácia antioxidante e as características físico-químicas dos compostos, o que poderá permitir o desenho de novos fármacos. Deste modo, é possível concluir que um composto com boas características antioxidantes além de ser um bom captador de radicais livres pela presença na sua estrutura de grupos químicos que favoreçam a inactivação desses radicais, deve ainda apresentar uma localização apropriada relativamente à membrana, capacidade de partilhar e de alterar as propriedades físico-químicas da membrana, como a fluidez.

4.6. BIBLIOGRAFIA

1. Bomalaski, J. S., Hirata, F., Clarke, M. A. (1986). Aspirin inhibits phospholipase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 139: 115-121.
2. Ghiselli, A., Serafini, M., Natella, F., Scaccini, C. (2000). Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Rad. Biol. Med.*, 29: 1106-1114.
3. Chen, S-X., Schopfer, P. (1999). Hydroxyl-radical production in physiological reactions. A novel function of peroxidase. *Eur. J. Biochem.*, 260: 726-735.
4. Nikolic, D., Breemen, R. B. (2001). DNA oxidation induced by cyclooxygenase-2. *Chem. Res. Toxicol.*, 14: 351-354.
5. Terao, J., Piskula, M. K. (1998). Flavonoids as inhibitors of lipid peroxidation in membranes. In: Rice-Evans CA, Packer L (eds) *Flavonoids in Health and Disease*. Marcel Dekker New York: 277-293.
6. Halliwell, B., Hoult, J. R., Blake, D. R. (1988). Oxidants, inflammation, and anti-inflammatory drugs. *FASEB J.*, 2: 2867-2873.
7. Zwart, L. L., Meerman, J. H. N., Commandeur, J. N. M., Vermeulen, N. P. E. (1999). Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Rad. Biol. Med.*, 26: 202-226.
8. Kitchen, E. A., Dawson, W., Rainsford, K. D., Cawston, T. (1985). *Anti-inflammatory and anti-rheumatic drugs*. CRC Press. Boca Raton.
9. Vane, J. R. (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature*, 231: 232-235.
10. Behl, C. (1999). Alzheimer's disease and oxidative stress: implications for novel therapeutic approaches. *Prog. Neurobiol.*, 57: 301-323.
11. Barclay, L. R. C., Ingold, K. U. (1981). Autooxidation of biological membranes. 2. The autooxidation of model membranes. A comparison of the autooxidation of egg lecitin phosphatidylcholine in water and in chlorobenzene. *J. Am. Chem. Soc.*, 103: 6478-6485.
12. Barclay, L. R. C., Macneil, J. M., Vankessel, J., Forrest, B. J., Porter, N. A., Lehman, J. S., Smith, K. J., Ellington, J. J. C. (1984). Autooxidation and aggregation of phospholipids in organic solvents. *J. Am. Chem. Soc.*, 106: 6740-6747.

13. Yamamoto, Y., Niki, E., Eguchi, J., Kamiya, Y., Shimasaki, H. (1985). Oxidation of biological membranes and its inhibition. Free radical chain oxidation of erythrocyte ghost membranes by oxygen. *Biochim. Biophys. Acta*, 819: 29-36.
14. Barclay, L. R. C., Baskin, K. A., Kong, D., Locke, S. J. (1987). Autoxidation of model membranes. The kinetics and mechanism of autoxidation of mixed phospholipid bilayers. *Can. J. Chem.*, 65: 2541-2550.
15. Aikens, J., Dix, T. A. (1993). Hydrodioxyl (perhydroxyl), peroxy, and hydroxyl radical-initiates lipid peroxidation of large unilamellar vesicles (liposomes): comparative and mechanistic studies. *Arch. Biochem. Biophys.*, 305: 516-525.
16. Houslay, M. D., Stanley, K. K. (1982). Dynamics of biological membranes - influence on synthesis, structure and function. John Wiley & Sons. London.
17. Barclay, L. R. C., Vinqvis, M. R. (1994). Membrane Peroxidation: inhibiting effects of water soluble antioxidants on phospholipids of different charge types. *Free Rad. Biol. Med.*, 16: 779-788.
18. Saija, A., Scalese, M., Lanza, M., Marzullo, D., Bonina, F., Castelli, F. (1995). Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free Rad. Biol. Med.*, 19: 481-486.
19. Castelli, F., Trombetta, D., Tomaino, A., Bonina, F., Romeo, G., Uccella, N., Saija, A. (1997). Dipalmitoylphosphatidylcholine/linoleic acid mixed unilamellar vesicles as model membranes for studies on novel free-radical scavengers. *J. Pharmacol. Toxicol.*, 37: 135-141.
20. Wiseman, H., Cannon, M., Arnstein, H. R. V., Halliwell, B. (1990). Mechanism of inhibition of lipid peroxidation by tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen introduced into liposomes. *FEBS Lett.*, 274: 107-110.
21. Facino, R. M., Carini, M., Aldini, G., Saibene, L., Macciocchi, A. (1993). Antioxidant profile of nimesulide, indomethacin and diclofenac in phosphatidylcholine liposomes (PCL) as membrane model. *Int. J. Tissue React.*, 15: 225-234.
22. Takahashi, M., Komuro, E., Niki, E., Tanaka, K. (1992). Action of fatty acid esters of L-ascorbic acid as antioxidants in phosphatidylcholine liposomal membranes. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 65: 679-684.
23. Niki, E. (1990). Free radicals initiators as source of water- or lipid-soluble peroxy radicals. *Methods Enzymol.*, 186: 100-108.

24. Arora, A., Nair, M. G., Strasburg, G. M. (1998). Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Rad. Biol. Med.*, 24: 1355-1363.
25. Kim, E. H., Sevanian, A. (1991). Hematin- and peroxide-catalyzed peroxidation of phospholipid liposomes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 288: 324-330.
26. Jana, A. K., Agarwal, S., Chatterjee, N. (1990). The induction of lipid peroxidation in liposomal membrane by ultrasound and the role of hydroxyl radicals. *Radiation Res.*, 124: 7-14.
27. Patel, R. P., Boersma, B. J., Crawford, J. H., Hogg, N., Kirk, M., Kalyanaraman, B., Parks, D. A., Barnes, S., Darley-USmar, V. (2001). Antioxidant mechanisms of isoflavones in lipid systems: paradoxical effects of peroxyl radical scavenging. *Free Rad. Biol. Med.*, 31: 1570-1581.
28. Wiseman, H. (1993). Vitamin D is a membrane antioxidant. *Fed. Eur. Biochem. Soc.*, 326: 285-288.
29. Wiseman, H., Quinn, P., Halliwell, B. (1993). Tamoxifen and related compounds decrease membrane fluidity in liposomes. *FEBS Lett.*, 330: 53-56.
30. Gutiérrez, M. E., García, A. F., Africa de Mandariaga, M., Sagrista, M. L., Casadó, F. J., Mora, M. (2003). Interaction of tocopherols and phenolic compounds with membrane lipid components: evaluation of their antioxidant activity in a liposomal model system. *Life Sci.*, 72: 2337-2360.
31. Horan, K. L., Lutzke, B. S., Cazars, A. R., McCall, J. M., Epps, D. E. (1994). Kinetic evaluation of lipophilic inhibitors of lipid peroxidation in DLPC liposomes. *Free Rad. Biol. Med.*, 17: 587-596.
32. Spiteller, G. (2003). Are lipid peroxidation processes induced by changes in the cell wall structure and how are these processes connected with diseases? *Med. Hypoth.*, 60: 69-83.
33. Esterbauer, H., Zollner, H., Schaur, R. J. (1988). Hydroxyalkenals: cytotoxic products of lipid peroxidation. *ISI Atlas-Biochem.*, 1: 311-315.
34. Jaeschke, H. (1995). Mechanisms of oxidant stress-induced acute tissue injury. *Exp. Biol. Med.*, 209: 104-111.
35. Dean, R. T., Thomas, S. M., Garner, A. (1986). Free radical-mediated fragmentation of monoamino oxidase in the mitochondrial membrana. Role of lipid radicals. *Biochem. J.*, 240: 289-294.
36. Wiseman, H., Cannon, M., Arnestein, H. R. V., Barlow, D. J. (1992). The structural mimicry of membrane sterols by tamoxifen: evidence from cholesterol

- coefficients and molecular-modelling for its action as a membrane anti-oxidant and anti-cancer agent. *Biochim. Biophys. Acta*, 138: 197-202.
37. Giamarellos-Bourboulisa, E. J., Tzivras, M., Kourtesas, D., Arnaoutis, T. P., Delladatsima, I., Dionyssiou-Asteriou, A., Davaris, P., Vafiadis-Zouboulis, I., Archimandritis, A. (2003). Lipid peroxidation in chronic gastritis; any influence of *Helicobacter pylori*? *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 68: 257-261.
38. Narushima, S., Spitz, D. R., Oberley, L. W., Toyokuni, S., Miyata, T., Gunnett, C. A., Buettner, G. R., Zhang, J., Ismail, H., Lynch, R. G., Berg, D. J. (2003). Evidence for oxidative stress in NSAID-induced colitis in IL10/mice. *Free Rad. Biol. Med.*, 34: 1153-1166.
39. Tsujimoto, Y., Saitoh, K., Kashima, M., Shiozawa, A., Kozuka, M., Hashizume, H., Kimura, K., Yamazaki, M., Fujii, A. (1998). Effect of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs on Lipid Peroxidation by Hydroxyl Radical. *Gen. Pharmacol.*, 31: 405-408.
40. Massaeli, H., Sobrattee, S., Pierce, G. N. (1999). The importance of lipid solubility in antioxidants and free radical generating systems for determining lipoprotein peroxidation. *Free Rad. Biol. Med.*, 26: 1524-1530.
41. Schaich, K. M., Borg, D. C. (1988). Fenton reactions in lipid phases. *Lipids*, 23: 570-579.
42. Fernandes, E., Costa, D., Toste, S. A., Lima, J. L. F. C., Reis, S. (2004). In vitro scavenging activity for reactive oxygen and nitrogen species by nonsteroidal anti-inflammatory indole, pyrrole, and oxazole derivative drugs. *Free Rad. Biol. Med.*, 37: 1895-1905.
43. Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.*, 49: 4619-4626.
44. Kachel, K., Asuncion-Punzalan, E., London, E. (1998). The location of fluorescence probes with charged groups in model membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1374: 63-76.
45. Kaiser, R. D., London, E. (1998). Location of diphenylhexatriene (DPH) and its derivatives within membranes: comparison of different fluorescence quenching analysis of membrane depth. *Biochemistry*, 37: 8180-8190.
46. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.*, 26: 1231-1237.

47. Lien, E. J., Ren, S., Bui, H-H., Wang, R. (1999). Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Rad. Biol. Med.*, 26: 285-294.
48. Son, S., Lewis, B. A. (2002). Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: structure-activity relationship. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 468-472.
49. Miller, J. N., Rice-Evans, C. A. (1997). Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS.+ radical cation assay. *Free Radic. Res.*, 26: 195-199.
50. Foti, M. C., Daquino, C., Geraci, C. (2004). Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DDPH[•] radical in alcoholic solutions. *J. Org. Chem.*, 69: 2309-2314.
51. Giacomelli, C., Miranda, F. D. S., Gonçalves, N. S., Spinelli, A. (2004). Antioxidant activity of phenolic and related compounds: a density functional theory study on the O-H bond dissociation enthalpy. *Redox Rep.*, 9: 263-269.
52. Wright, J. S., Johnson, E. R., DiLabio, G. A. (2001). Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.*, 123: 1173-1183.
53. Zhang, H-Y., Sun, Y-M., Wang, X-L. (2003). Substituent effects on O-H bond dissociation enthalpies and ionization potentials of catechols: a DFT study and its implications in the rational design of phenolic antioxidants and elucidation of structure-activity relationships for flavonoid antioxidants. *Chem.-Eur. J.*, 9: 502-508.
54. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci. Technol. - LEB*, 28: 25-30.
55. Wright, J. S., Carpenter, D. J., McKay, D. J., Ingold, K. U. (1997). Theoretical calculation of substituent effects on the O-H bond strength of phenolic antioxidants related to vitamin E. *J. Am. Chem. Soc.*, 119: 4245-4252.
56. Vinqvist, M. R., Barclay, L. R. (2000). On the antioxidant mechanism of curcumin: classic methods are needed to determine antioxidant activity. *Org. Lett.*, 2: 2841-2843.
57. Huang, D., Boxin, O., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., Prior, R. L. (2002). High-Throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)

- Using a Multichannel Liquid Handling System Coupled with a Microplate Fluorescence Reader in 96-Well Format. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 4437-4444.
58. Cao, G., Prior, R. L. (1998). Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin. Chem.*, 44: 1309-1315.
59. Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric.*, 76: 270-276.
60. Yen, G-C., Chen, H-Y., Peng, H-H. (1997). Antioxidant and pro-oxidant effects of various tea extracts. *J. Agric. Food Chem.*, 45: 30-34.
61. Hsieh, C-L., Yen, G-C. (2000). Antioxidant actions of Du-Zhong (*Eucommis Ulmoides Oliv.*) toward oxidative damage in biomolecules. *Life Sci.*, 66: 1387-1400.
62. Tsai, R-S., Carrupt, P-A., Tayar, N. E., Giroud, Y., Andrade, P., Testa, B., Brée, F., Tillement, J. P. (1993). Physicochemical and Structural Properties of Non Steroidal Anti-inflammatory oxicams. *Helv. Chim. Acta*, 76: 842-854.
63. Cervato, G., Viani, P., Masserini, M., Di Iorio, C., Cestaro, B. (1988). Studies on peroxidation of arachidonic acid in different liposomes below and above phase transition temperature. *Chem. Phys. Lipids*, 49: 135-139.
64. Gaudiano, M. C., Valvo, L., Bertocchi, P., Manna, L. (2003). RP-HPLC study of the degradation of diclofenac and piroxicam in the presence of hydroxyl radicals. *J. Pharmaceut. Biomed.*, 32: 151-158.
65. Takayama, F., Egashira, T., Yamanaka, Y. (1994). Effect of diclofenac, a non-steroidal anti-inflammatory drug, on lipid peroxidation caused by ischemia-reperfusion in rat liver. *Jpn. J. Pharmacol.*, 64: 71-78.
66. Gavella, M., Kveder, M., Lipovac, V., Rakos, R., Pifat, G. (2005). Trisialogangloside GT1b prevents increase in sperm membrane molecular ordering by in vitro lipid peroxidation. *J. Androl.*, 26: 724-731.
67. Dobretsov, G. E., Borschevskaya, T. A., Petrov, V. A., Vladimirov, Y. (1977). The increase of phospholipid bilayer rigidity after lipid peroxidation. *FEBS Lett.*, 84: 125-128.
68. Arora, A., Strasburg, G. M. (1997). Development and validation of fluorescence spectroscopy assays to evaluate antioxidant efficacy. Application to metal quelators. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 74: 1031-1040.

69. Fessenden, R. W., Hitachi, A., Nagarajan, V. (1984). Measurement of the dipole moment of a peroxy radical by microwave dielectric absorption. *J. Phys. Chem.*, 88: 107-110.
70. Boyd, S. L., Boyd, R. J., Barclay, L. R. C. (1990). A theoretical investigation of the structures and properties of peroxy radicals. *J. Am. Chem. Soc.*, 112: 5724-5730.
71. Niki, E., Kawakami, A., Yamamoto, Y., Kamiya, Y. (1985). Oxidation of lipids, VIII. Synergistic inhibition of oxidation of phosphatidylcholine liposome in aqueous dispersion by vitamin E and vitamin C. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 58: 1971-1975.
72. Motoyama, T., Masayuki, M., Mino, M., Takahashi, M., Niki, E. (1989). Synergistic inhibition of oxidation in dispersed phosphatidylcholine liposomes by a combination of vitamin E and cysteine. *Arch. Biochem. Biophys.*, 270: 655-661.
73. Barclay, L. R. C. (1988). The cooperative antioxidant role of glutathione with a lipid soluble and a water-soluble antioxidant during peroxidation of liposomes initiated in the aqueous phase and in the lipid phase. *J. Biol. Chem.*, 263: 16138-16142.
74. Wang, X., Quinn, P. J. (2000). The location and function of vitamin E in membranes (Review). *Mol. Membr. Biol.*, 17: 143-156.
75. Quinn, P. J. (2004). Is the distribution of α -tocopherol in membranes consistent with its putative functions? *Biochemistry (Moscow)*, 69: 58-66.
76. Ferreira, H., Lúcio, M., Lima, J. L. F. C., Matos, C., Castro, B., Reis, S. (2005). Effects of diclofenac on EPC liposome membrane properties. *Anal. Bioanal. Chem.*, 382: 1256-1264.
77. Ferreira, H., Lúcio, M., Lima, J. L. F. C., Matos, C., Castro, B. d., Reis, S. (2005). Interaction of clonixin with EPC liposomes used as membrane models. *J. Pharm. Sci.*, 94: 1277-1287.
78. Netter, P., Bannwarth, B., Royer-Morrot, M. J. (1989). Recent findings on the pharmacokinetics of non-steroidal anti-inflammatory drugs in synovial fluid. *Clin. Pharmacokinet.*, 17: 145-162.
79. Urquhart, E. (1991). A comparison of synovial fluid concentrations of non-steroidal anti-inflammatory drugs with their in vitro activity. *Agents Actions*, 32: 261-265.

80. Graf, P., Glatt, M., Brune, K. (1975). Acidic non-steroid anti-inflammatory drugs accumulating in inflamed tissue. *Experientia*, 31: 951-953.
81. Gay, J. C., Lukens, J. N., English, D. K. (1984). Differential inhibition of neutrophil superoxide generation by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Inflammation*, 8: 209-222.
82. Valentao, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Andrade, P. B., Seabra, R. M., Bastos, M. L. (2002). Antioxidative properties of cardoon (*Cynara cardunculus* L.) infusion against superoxide radical, hydroxyl radical, and hypochlorous acid. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 4989-4993.
83. Stetinova, V., Smetanova, L., Grossmann, V., Anzenbacher, P. (2002). In vitro and in vivo assessment of the antioxidant activity of melatonin and related indole derivatives. *Gen. Physiol. Biophys.*, 21: 153-162.

CAPÍTULO 5

AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE E DOS EFEITOS DOS AINES NA FLUIDEZ MEMBRANAR DE ESPLENÓCITOS USADOS COMO MODELOS DAS BIOMEMBRANAS

CAPÍTULO 5. AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE E DOS EFEITOS DOS AINES NA FLUIDEZ MEMBRANAR DE ESPLENÓCITOS USADOS COMO MODELOS DAS BIOMEMBRANAS

5.1. INTRODUÇÃO

As biomembranas exibem uma estrutura altamente dinâmica e fluida, que permite a preservação de todas as suas funções biológicas. No entanto, a interacção de moléculas iónicas ou polares com a superfície membranar ou a penetração e localização de moléculas hidrofóbicas no interior da bicamada e a peroxidação lipídica podem induzir perturbações nas suas propriedades biofísicas [1-6]. Estas modificações podem ser observadas por estudos de fluidez membranar, os quais mostraram ser importantes para o esclarecimento quer de mecanismos biológicos, quer de condições patológicas, como inflamação crónica, cancro e doenças cardiovasculares [3, 7-12]. Apesar de existirem vários métodos para avaliar a fluidez da membrana, como por exemplo, a calorimetria diferencial de varrimento (DSC), a polarização generalizada de Laurdan e os estudos de perda da carboxifluoresceína, a técnica mais largamente utilizada é a anisotropia de fluorescência de estado estacionário. De facto, existem numerosos estudos na literatura científica acerca da influência dos fármacos na fluidez membranar por determinações de anisotropia de fluorescência, alguns dos quais realizados em membranas biológicas. Por exemplo, foi sugerido por alguns autores que a diminuição da fluidez membranar causada pela indometacina modificava a funcionalidade de alguns receptores *in vivo*, presumivelmente devido a alterações no movimento ou orientação das proteínas que se localizam no interior da matriz lipídica da bicamada [7, 13]. Por conseguinte, parece que a região hidrocarbonada da membrana deve possuir uma importante função no estabelecimento das interacções proteína-lípido e não constituir apenas uma matriz

hidrofóbica, na qual as proteínas membranares podem desempenhar as suas funções. Além disso, foi proposto que a anisotropia de fluorescência poderia ser utilizada no estudo da acção farmacológica de fármacos anti-reumáticos e na monitorização da terapia anti-reumática, uma vez que alguns fármacos usados no tratamento da artrite reumatóide induzem alterações na membrana dos linfócitos [10]. Adicionalmente, foi observado um aumento na fluidez membranar de queratinócitos isolados a partir da pele de doentes psoriáticos, relativamente à verificada nas células epidérmicas isoladas da pele de humanos saudáveis. Como resultado, foi sugerido que o estudo da fluidez membranar em queratinócitos isolados de pele saudável ou mórbida representa um progresso técnico na detecção da psoríase, uma vez que a fluidez da membrana plasmática pode ser medida numa pequena quantidade de tecido obtido numa biópsia [8].

Os estudos de fluidez membranar têm também sido considerados como uma perspectiva promissora na terapia do cancro. As células metastáticas tumorais apresentam uma fluidez da membrana plasmática superior à observada em células não metastáticas. Assim, uma diminuição da fluidez membranar pode restabelecer a inibição da ligação entre as células metastáticas tumorais, pelo aumento da rigidez das células ao nível do ponto de união celular [12, 14-16]. Por este motivo, na presença de compostos que tenham essa capacidade, a divisão celular pode ser mais lenta como consequência da fluidez da membrana se encontrar diminuída.

Além do referido, é ainda bem conhecida a existência de uma relação entre a peroxidação lipídica e a fluidez da membrana [17-20]. De facto, as espécies reactivas de oxigénio, como por exemplo, os radicais peróxido ($\text{ROO}^\bullet$), possuem capacidade de oxidar os fosfolípidos polinsaturados, induzindo consequentemente alterações na composição e nas propriedades físicas das membranas, como por exemplo, modificações da fluidez membranar [2-6, 21]. Finalmente, tem sido sugerido que a citopatogenicidade do HIV e de outros vírus com envólucro ou envelope é reduzida por agentes fluidificantes da membrana [11].

O conjunto de resultados descritos na literatura e obtidos em estudos de anisotropia de fluorescência mostra claramente que a influência dos fármacos na fluidez membranar é um importante parâmetro para esclarecer o seu mecanismo de acção e para a elucidação de uma diversidade de condições patológicas, como estados inflamatórios crónicos, carcinogénese, doenças cardiovasculares e mesmo do processo de envelhecimento. Deste modo, uma vez que a anisotropia de fluorescência de estado estacionário mostrou ser útil na monitorização das alterações estruturais

nas biomembranas, utilizou-se, neste estudo, este método para monitorizar a variação de fluidez nas membranas dos esplenócitos usando a sonda 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH). De facto, a sonda DPH e os seus derivados são frequentemente as sondas de fluorescência escolhidas nos estudos da estrutura e propriedades dinâmicas das membranas, tendo sido muitas vezes usadas para estimar a ordenação e a fluidez da membrana [22-24]. Neste contexto, um dos objectivos do presente trabalho foi verificar os efeitos dos fármacos anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) indometacina, diclofenac, piroxicam, tenoxicam, indoprofeno, clonixina e etodolac, na microviscosidade das membranas celulares, para uma melhor compreensão da capacidade destes fármacos em induzirem perturbações na estrutura membranar e, assim, contribuir para o esclarecimento da sua acção farmacológica. Além de proporcionar um método para investigar os efeitos dos AINEs na fluidez membranar, o que já foi estudado em lipossomas, usados como modelos membranares, o presente trabalho tem também em atenção a análise dos resultados. Com efeito, para evitar interpretações ambíguas, é necessário considerar correcções apropriadas aos dados experimentais, que serão posteriormente apresentadas.

O outro objectivo principal deste estudo com esplenócitos está relacionado com a avaliação da actividade antioxidante dos AINEs face à peroxidação lipídica. Com efeito, um dos componentes da célula que é particularmente susceptível ao ataque oxidativo das espécies reactivas de oxigénio geradas *in vivo* é a membrana, devido à presença de lípidos que apresentam na sua constituição ácidos gordos polinsaturados, os quais podem ser facilmente oxidados, com um resultante aumento da rigidez membranar e, muitas vezes, morte celular [12, 25]. Por conseguinte, como referido anteriormente, os dois objectivos deste trabalho podem estar relacionados, uma vez que tem sido descrito que a capacidade dos fármacos em penetrar e interagir com a membrana pode modificar, numa extensão significativa, as propriedades físicas da membrana e estas modificações podem contrariar a rigidez membranar resultante da peroxidação e/ou produzir efeitos secundários que complementam favoravelmente ou até mesmo promovem as desejadas características de captura dos radicais livres ou impedem a propagação da oxidação [3, 17, 20, 26].

Os radicais livres são espécies químicas extremamente reactivas que podem induzir uma grande variedade de danos ao nível celular, por exemplo, podem inactivar a síntese ou alterar a integridade do ADN ou danificar as biomembranas, atacando as proteínas envolvidas no transporte de iões ou induzindo alterações na sua composição e propriedades físico-químicas. Assim, devido ao elevado potencial para danificar

sistemas biológicos vitais, as espécies reactivas contribuem para o envelhecimento e desenvolvimento de mais de 100 estados patológicos, como por exemplo, aterosclerose, cancro, esclerose múltipla, doença de Alzheimer e de Parkinson [27, 28]. Adicionalmente, essas espécies apresentam um importante papel nas lesões celulares induzidas nos processos inflamatórios crónicos e nas várias desordens do sistema nervoso central [28]. Para inactivar estas espécies reactivas e para reduzir os seus danos, os organismos vivos desenvolveram complexos sistemas antioxidantes. Estes sistemas antioxidantes incluem enzimas, como a superóxido dismutase, a catalase e a glutathione peroxidase; macromoléculas, como a albumina e a ferritina; e um conjunto de pequenas moléculas, incluindo o ácido ascórbico, o α -tocoferol, o β -caroteno, a glutathione reduzida, a metionina, o ácido úrico e a bilirrubina [27, 28]. Assim, antioxidantes que ajudem as células a resistir ao stress oxidativo, pela sua capacidade de inactivar eficazmente os radicais livres de oxigénio e azoto (ROS/RNS), têm sido associados à prevenção de várias doenças. Há, assim, uma necessidade crescente de conhecer a capacidade antioxidante de fármacos, com vista a utilizá-los na prevenção ou terapia das diversas doenças apontadas. De facto, encontra-se descrito na literatura que vários AINEs e compostos fenólicos apresentam actividade anti-inflamatória pela captura de radicais livres, pois são capazes de inactivar as espécies reactivas mediadoras da inflamação *in vivo*, produzidas pelas células fagocíticas [4, 28-31].

O estudo da actividade antioxidante dos anti-inflamatórios é, assim, de extrema importância, uma vez que durante a inflamação os sistemas de defesa antioxidantes endógenos devem estar diminuídos, aumentando, deste modo, a importância de antioxidantes exógenos. Adicionalmente, a actividade antioxidante face ao radical peróxido pode ter extremo valor, uma vez que este radical parece ser um importante iniciador da peroxidação lipídica *in vivo* [32, 33] e também devido ao facto de, durante o processo inflamatório, as membranas das células dos tecidos afectados estarem mais sujeitas à peroxidação lipídica, explicando, deste modo, o aumento de marcadores de peroxidação nas doenças inflamatórias. Por exemplo, uma elevada concentração de marcadores da peroxidação lipídica é detectada em amostras de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) obtidas de pacientes que padecem de aterosclerose, artrite reumatóide ou infecção bacteriana [30, 34, 35]. Assim, este contexto sugere fortemente que a capacidade antioxidante dos AINEs poderá estar relacionada com as suas propriedades terapêuticas no tratamento da inflamação.

Neste estudo, avaliou-se a actividade antioxidante dos AINEs etodolac, piroxicam, tenoxicam, clonixina, diclofenac e indoprofeno relativamente à peroxidação lipídica induzida pelos radicais peroxilo gerados por decomposição térmica do iniciador azo AAPH (dicloridrato de 2,2'-azobis-2-amidinopropano), através da monitorização da oxidação da sonda fluorescente DPH-PA (ácido 3-(*p*-(6-fenil)-1,3,5-hexatrienil)fenilpropiónico), incorporada nas membranas celulares dos esplenócitos. Assim, a metodologia utilizada permitiu observar a degradação peroxidativa da sonda DPH-PA pela diminuição da sua fluorescência e, adicionalmente, permitiu o estudo da fluidez membranar por anisotropia de fluorescência, uma vez que durante a oxidação se formam domínios mais rígidos ao nível das cadeias de ácidos gordos, como referido anteriormente. Adicionalmente, a avaliação da actividade antioxidante dos AINEs face aos radicais peroxilo, gerados na fase aquosa, constitui uma ferramenta valiosa para a determinação da eficácia antioxidante destes fármacos, uma vez que as biomembranas são continuamente atacadas por radicais livres gerados na fase aquosa das fracções celular e subcelulares [36].

5.2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

5.2.1. Avaliação da fluidez membranar por anisotropia de fluorescência

A avaliação da fluidez membranar da membrana celular de esplenócitos por anisotropia de fluorescência baseou-se no princípio descrito no capítulo 3 para a realização deste mesmo estudo, mas em lipossomas (3.2.4.2). Contudo, neste estudo utilizou-se a sonda 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH), que é uma molécula que permite avaliar a microviscosidade interna das membranas em quase toda a matriz lipídica [23, 37]. Esta sonda tem sido, assim, extensamente utilizada na análise da fluidez membranar de células em condições normais e patológicas [10, 23].

As sondas fluorescentes podem fornecer resultados qualitativos fidedignos sobre as alterações globais que ocorrem na fluidez membranar, mas tais dados necessitam de ser cuidadosamente interpretados de modo a evitar algumas ambiguidades, como já referido em 3.2.4.2 do capítulo 3. De facto, como referido neste tipo de estudo efectuado em lipossomas, há duas grandes dificuldades a considerar na avaliação da fluidez da membrana por anisotropia de estado estacionário (uma terceira

poderia advir se a localização da sonda na membrana não fosse conhecida). Uma delas está relacionada com a existência de limitações aos movimentos rotacionais das sondas de fluorescência quando inseridas em ambiente membranar e a outra com o facto das variações de anisotropia poderem ser causadas tanto por uma alteração no tempo de vida do estado excitado do fluoróforo, τ , como por uma alteração no tempo de relaxamento rotacional, θ . Contudo, assim como nos estudos efectuados com LUVs como modelos membranares, os problemas referidos puderam ser obviados para que fosse possível uma interpretação correcta dos resultados.

A sonda DPH está inserida na bicamada lipídica com o seu eixo longitudinal paralelo às cadeias acil dos fosfolípidos [37]. A rotação da sonda em torno do seu eixo horizontal não origina despolarização da luz emitida e apenas o movimento oscilante ao redor do eixo, que se posiciona no plano da membrana, pode ser observado. Este movimento oscilante da sonda DPH poderia-se encontrar impedido nas bicamadas lipídicas [37] e, deste modo, a despolarização teria que ser descrita pela equação de Perrin modificada. No entanto, estudos prévios em membranas no estado fluído [37] mostraram que o valor de r_{∞} é próximo de zero. Assim, a equação de Perrin pode ser utilizada para descrever a despolarização (equação 3.33) [38].

Como anteriormente referido nos estudos realizados com os LUVs, a segunda dificuldade apontada pode ser eliminada através da utilização de valores de anisotropia corrigidos (r' ; equação 3.38) [38]. Assim, considerando na equação 3.38 r_{ss} como o valor de anisotropia medido nas membranas dos esplenócitos na ausência de fármaco (desactivador), ou seja, obtido para τ_0 , e os valores publicados de θ e τ_0 para a sonda DPH [37], é possível obter os valores de anisotropia corrigida, r' , uma vez que os valores de τ' podem também ser facilmente determinados pela equação 3.36. Estes valores de r' correspondem à variação de anisotropia obtida devida à alteração dos tempos de vida do fluoróforo (sonda) e devem ser depois comparados com os valores experimentais de anisotropia (r_{ss}), como referido anteriormente. Deste modo, através da diferença de r_{ss} e r' é possível obter a variação real de anisotropia causada pelo fármaco e sem a variação intrínseca devida ao decréscimo do tempo de vida da sonda de fluorescência. Quando os valores referentes a r_{ss} se apresentam menores que os obtidos para r' é possível concluir que a fluidez da membrana aumentou. A diferença entre r_{ss} e r' é, assim, uma medida do efeito de fluidificação.

5.2.2. Avaliação da actividade antioxidante por fluorimetria e anisotropia de fluorescência

A actividade antioxidante de compostos face à peroxidação lipídica induzida por radicais pode ser avaliada pela sonda DPH-PA, a qual já tinha sido anteriormente utilizada com o mesmo objectivo em lipossomas unilamelares. Este estudo com esplenócitos, como o efectuado com LUVs como modelos membranares, visou avaliar quer o decréscimo da intensidade de fluorescência da sonda fluorescente, que resulta da sua própria oxidação, quer a influência na fluidez da membrana por estudos de anisotropia de fluorescência. Deste modo, neste trabalho avaliou-se a capacidade captadora dos radicais $\text{ROO}^\bullet$ pelos compostos em estudo, que está directamente relacionada com a sua facilidade em doar um átomo de hidrogénio à espécie reactiva (mecanismo de transferência de um átomo de hidrogénio) e ainda se a actividade antioxidante era complementada pela indução de alterações ao nível da fluidez membranar. Com efeito, alguns compostos, como o tamoxifeno e o colesterol, exercem a sua acção antioxidante apenas pela estabilização da membrana celular [20].

Os resultados obtidos nos ensaios de fluorescência e de anisotropia de fluorescência foram analisados de acordo com o descrito neste tipo de estudos em LUVs (4.2.3). Assim, após a conversão dos dados experimentais em valores relativos, determinou-se a área sob a curva (AUC) numa representação gráfica da fluorescência ou anisotropia relativa *versus* tempo. Posteriormente, o cálculo da razão da diferença das áreas sobre a curva (AUC) dos compostos em estudo e do controlo de peroxidação (sem fármaco/antioxidante de referência) pela área sob a curva do controlo de peroxidação ($(\text{AUC}_{\text{AINE/Antioxidante de referência}} - \text{AUC}_{\text{AAPH}}) / \text{AUC}_{\text{AAPH}}$; para os estudos de anisotropia de fluorescência o numerador da divisão foi invertido, para evitar a obtenção de valores negativos) permitiu avaliar a actividade antioxidante do AINE em estudo. A obtenção de valores superiores à unidade significa que o composto em estudo apresenta actividade antioxidante. O cálculo da área sob a curva, como referido em estudos anteriores com este tipo de determinação, permitiu combinar num só valor o tempo e o grau de inibição dos radicais pelo composto antioxidante [27, 39].

5.3. PARTE EXPERIMENTAL

5.3.1. Reagentes

A indometacina, a glutamina, a penicilina e a estreptomicina foram adquiridas à Sigma-Aldrich e o soro bovino fetal à Gibco. A sonda fluorescente 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) foi requerida à Molecular Probes. Os restantes reagentes encontram-se mencionados nos capítulos 2 e 4. Todos os reagentes citados, de qualidade p. a., foram usados sem qualquer purificação adicional.

5.3.2 Isolamento de esplenócitos de ratinho

Os ratinhos Balb/c, obtidos da Harlen Iberica (Espanha), foram sacrificados por deslocamento cervical. De seguida, numa câmara de fluxo laminar, foi-lhes retirado e homogeneizado o baço em meio de cultura RPMI 1640, numa placa de Petri. As células, assim obtidas, foram ressuspensas e colocadas em gelo durante aproximadamente 5 min, para que depositassem os agregados maiores, como restos da cápsula fibrosa. Após este intervalo de tempo, submeteu-se o sobrenadante a uma centrifugação (1200 rpm durante 10 min a 4°C) e o sedimento celular, assim obtido, foi ressuspensado em meio de cultura RPMI, suplementado com glutamina (2 mM), penicilina e estreptomicina (100 U/mL e 100 µg/mL, respectivamente), hepes (2 mM) e soro bovino fetal (10%). Posteriormente, ajustou-se a concentração de esplenócitos a 1×10^7 céls/mL de meio de cultura.

5.3.3. Avaliação da influência dos AINEs na fluidez membranar

A sonda utilizada para monitorizar a fluidez das membranas celulares dos esplenócitos foi a DPH. Para a incorporação desta sonda nas células, a solução de DPH em dimetilsulfóxido (DMSO) foi diluída 100 vezes em tampão hepes (10 mM, $I = 0,1$ M, pH 7,4), de modo a obter uma solução com concentração de 1×10^{-5} M. Antes da incorporação da sonda DPH, as células foram centrifugadas e ressuspensas em volume equivalente de tampão hepes (10 mM, $I = 0,1$ M, pH 7,4) filtrado sob vácuo, de modo a eliminar os compostos fluorescentes que o meio de cultura possuía. Posteriormente, uma alíquota de 1 mL da solução da sonda DPH foi adicionada a um

volume igual de suspensão celular (1×10^7 céls/mL) em tampão hepes. A incorporação da sonda DPH nas membranas dos esplenócitos foi acompanhada por um aumento na intensidade de fluorescência.

Em seguida, a suspensão resultante foi colocada a incubar em gelo durante 1 hora no escuro, para promover a incorporação total da sonda nas membranas. Após o período de incubação, foi preparada uma série de amostras com uma concentração fixa de células (1×10^6 céls/mL) e concentrações crescentes de AINEs em tampão hepes (10 mM, $I = 0,1$ M, pH 7,4). O intervalo final de concentrações dos fármacos foi de 0 a 120 μ M para o piroxicam e tenoxicam, de 0 a 350 μ M para a indometacina, de 0 a 640 μ M para o indoprofeno e etodolac, e de 0 a 650 μ M para o diclofenac e clonixina. Depois de uma incubação no escuro durante 1 hora à temperatura ambiente, as amostras foram usadas para os estudos de fluidez membranar.

O aparelho utilizado foi o mesmo descrito para os estudos de anisotropia de estado estacionário em lipossomas (3.3.5.2), após a colocação dos polarizadores. As leituras foram realizadas a $37,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ em células para fluorescência com 1 cm de percurso óptico e obtidas conforme o descrito por Lacowitz *et al* [38]. O comprimento de onda de excitação e de emissão foram definidos a 361 nm e a 432 nm, respectivamente.

A desactivação de fluorescência, assim como nos ensaios efectuados com lipossomas, foi feita no mesmo fluorímetro referido anteriormente, mas sem a colocação dos polarizadores (os comprimentos de onda de excitação/emissão foram os descritos anteriormente). Os valores de intensidade de fluorescência foram corrigidos para a absorvância do desactivador (AINE) no comprimento de onda de excitação [40]. Estas determinações foram feitas em células de quartzo a $37,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ num espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 45 UV/VIS, já anteriormente descrito (3.3.5.2), a 361 nm.

5.3.4. Avaliação da actividade antioxidante dos AINEs face à peroxidação lipídica induzida pelos radicais ROO[•]

A sonda DPH-PA foi incorporada nas membranas celulares dos esplenócitos pelo mesmo método descrito para a sonda DPH nos estudos de fluidez membranar. Assim como a sonda DPH, a sonda DPH-PA foi também dissolvida em DMSO, mas

após diluição (100 vezes) com tampão hepes a sua concentração era igual a 4×10^{-5} M.

Para a realização dos ensaios de peroxidação quer pela avaliação do decréscimo da intensidade de fluorescência da sonda DPH-PA, quer pelo aumento da anisotropia de fluorescência, adicionou-se a 1 mL da suspensão celular (5×10^6 céls/mL), contida numa célula de fluorimetria munida com agitador e termostatzada a $37,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, diferentes concentrações de AINEs (0 a $106 \mu\text{M}$ de tenoxicam, 0 a $50 \mu\text{M}$ de piroxicam, 0 a $169 \mu\text{M}$ de etodolac, 0 a $170 \mu\text{M}$ de indoprofeno, e 0 a $222 \mu\text{M}$ de clonixina) ou trolox (0 a $18 \mu\text{M}$), usado como antioxidante de referência.

Após um período de incubação de 10 min, a $37,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, iniciou-se a peroxidação lipídica pela adição do indutor hidrossolúvel de peroxidação AAPH (15 mM).

Foram realizados os três ensaios controlo, mencionados em 4.3.4, para os estudos na presença de LUVs, nomeadamente o ensaio controlo de peroxidação ou branco, o ensaio controlo para a sonda DPH e os ensaios controlo para os AINEs e antioxidante de referência em estudo.

A monitorização da fluorescência e da anisotropia de estado estacionário foi efectuada, durante aproximadamente 120 min, no mesmo espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS 50B descrito para este mesmo ensaio em lipossomas. O comprimento de onda de excitação utilizado foi de 384 nm e o comprimento de onda de emissão de 435 nm. As medidas de anisotropia de fluorescência foram realizadas após a colocação dos polarizadores.

5.3.5. Verificação da viabilidade celular

Para verificar a toxicidade dos fármacos usados para os esplenócitos, nos vários estudos referidos, foi realizado o ensaio de exclusão do azul de tripano. As células na presença de azul de tripano a 0,4% (1:1, V/V) foram contadas com a ajuda de um hemocitómetro e a citotoxicidade foi avaliada em percentagem de células viáveis na presença das diferentes concentrações de fármaco usadas. Quando a viabilidade das células na presença de fármaco era inferior a 70%, os resultados obtidos não foram considerados [41].

5.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.4.1. Avaliação da influência dos AINEs na fluidez membranar

A alteração da fluidez membranar, resultante da interacção dos AINEs indometacina, piroxicam, tenoxicam, indoprofeno, diclofenac, clonixina e etodolac com as membranas de esplenócitos de ratinhos, foi efectuada por estudos de anisotropia de fluorescência de estado estacionário. O presente trabalho também analisa cuidadosamente os resultados obtidos experimentalmente, pois as sondas fluorescentes (como a sonda DPH) por si só influenciam significativamente os dados obtidos, o que pode originar interpretações ambíguas.

Para se efectuar o cálculo dos valores de τ' (equação 3.36), necessários para a determinação de r' , foi necessário determinar os valores da intensidade de fluorescência da sonda DPH na presença de concentrações crescentes de fármaco. Os anti-inflamatórios em estudo, com excepção do indoprofeno, etodolac e diclofenac, mostraram-se capazes de provocar a desactivação de fluorescência da sonda DPH. A Figura 5.1 apresenta a intensidade de fluorescência da sonda DPH em membranas de esplenócitos, na ausência e na presença de concentrações crescentes de fármaco. A clonixina, presente nesta Figura, corresponde a um exemplo de um fármaco capaz de desactivar a fluorescência da sonda, do que resultou um decréscimo na intensidade de fluorescência, enquanto o diclofenac representa um dos fármacos que não apresentam essa capacidade e, portanto, a intensidade de fluorescência da sonda DPH manteve-se praticamente constante em todo o intervalo de concentrações usado para este fármaco.

A desactivação de fluorescência da sonda DPH pelos anti-inflamatórios clonixina, indometacina, piroxicam e tenoxicam ocorreu sem provocar alterações significativas no espectro da sonda e, adicionalmente, obteve-se uma função linear de $I_0/I-1$ versus $[Q]_t$ (concentração total de fármaco) pela equação de Stern-Volmer (equação 3.28) [38, 42] o que possibilitou a utilização da equação 3.36 para o cálculo dos valores de τ' . Na Figura 5.2 é possível observar as rectas de Stern-Volmer obtidas na presença da sonda DPH incorporada nas biomembranas dos esplenócitos e dos AINEs clonixina e indometacina.

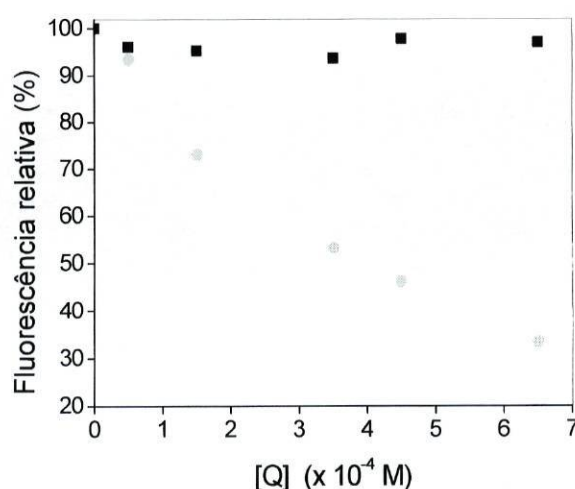


Figura 5.1: Intensidade de fluorescência relativa (%) da sonda DPH incorporada em membranas de esplenócitos na presença de concentrações crescentes de diclofenac (■) e clonixina (●).

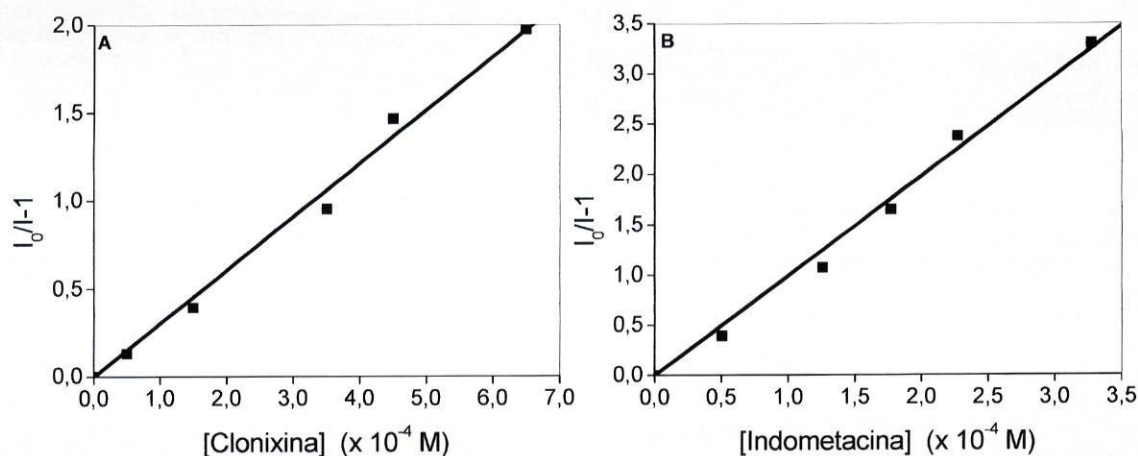


Figura 5.2: Correlação de $I_0/I-1$ e $[Q]$, de acordo com a equação de Stern-Volmer obtida para a sonda DPH incorporada na membrana de esplenócitos para a clonixina (A) e indometacina (B), a pH igual a 7,4.

Após o cálculo dos valores de anisotropia corrigidos, tornou-se então possível avaliar os efeitos dos AINEs em estudo na fluidez membranas dos esplenócitos. Na Figura 5.3 é possível efectuar a comparação de r' com r_{ss} e na Figura 5.4 pode-se observar a respectiva diferença obtida para a sonda DPH incorporada em membranas de esplenócitos com o aumento da concentração dos AINEs em estudo.

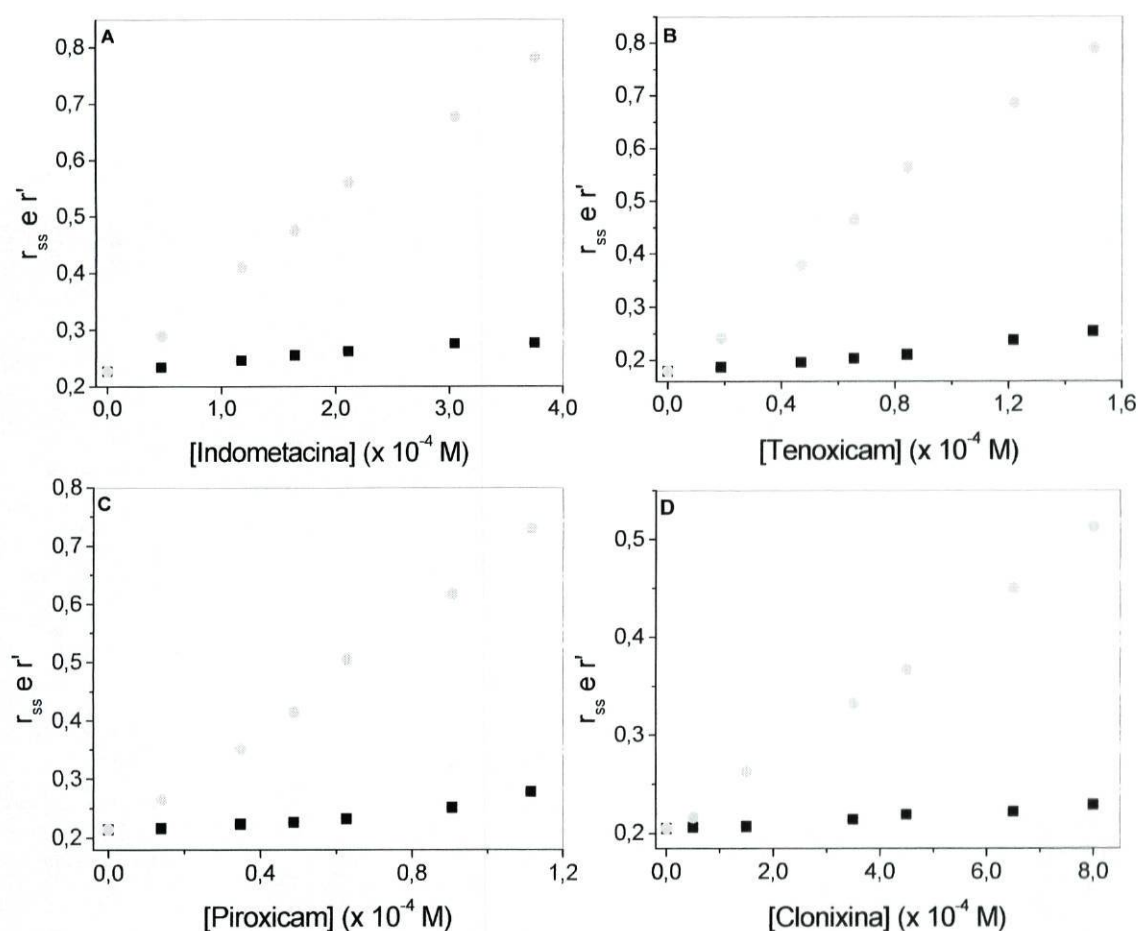


Figura 5.3: Valores de anisotropia corrigida, r' (●), e experimentais, r_{ss} (■) obtidos na presença da sonda DPH incorporada em membranas de esplenócitos (1×10^6 céls/mL) e de concentrações crescentes de indometacina (A), tenoxicam (B), piroxicam (C) e clonixina (D), a pH igual a 7,4.

Os resultados apresentados na Figura 5.3 mostram que os valores de r' são superiores, mas apresentam a mesma tendência dos valores de r_{ss} . Portanto, como a diferença entre r_{ss} e r' diminuiu na presença de concentrações crescentes de indometacina, clonixina, piroxicam e tenoxicam (Figura 5.4) é possível concluir que estes fármacos provocaram um aumento da fluidez membranar. De facto, os AINEs clonixina, indometacina, piroxicam e tenoxicam provocaram uma fluidificação da membrana tanto maior quanto maior a concentração dos mesmos. Para os outros fármacos estudados (diclofenac, indoprofeno e etodolac) não se observou uma perturbação evidente na fluidez das membranas sob as condições experimentais usadas neste estudo.

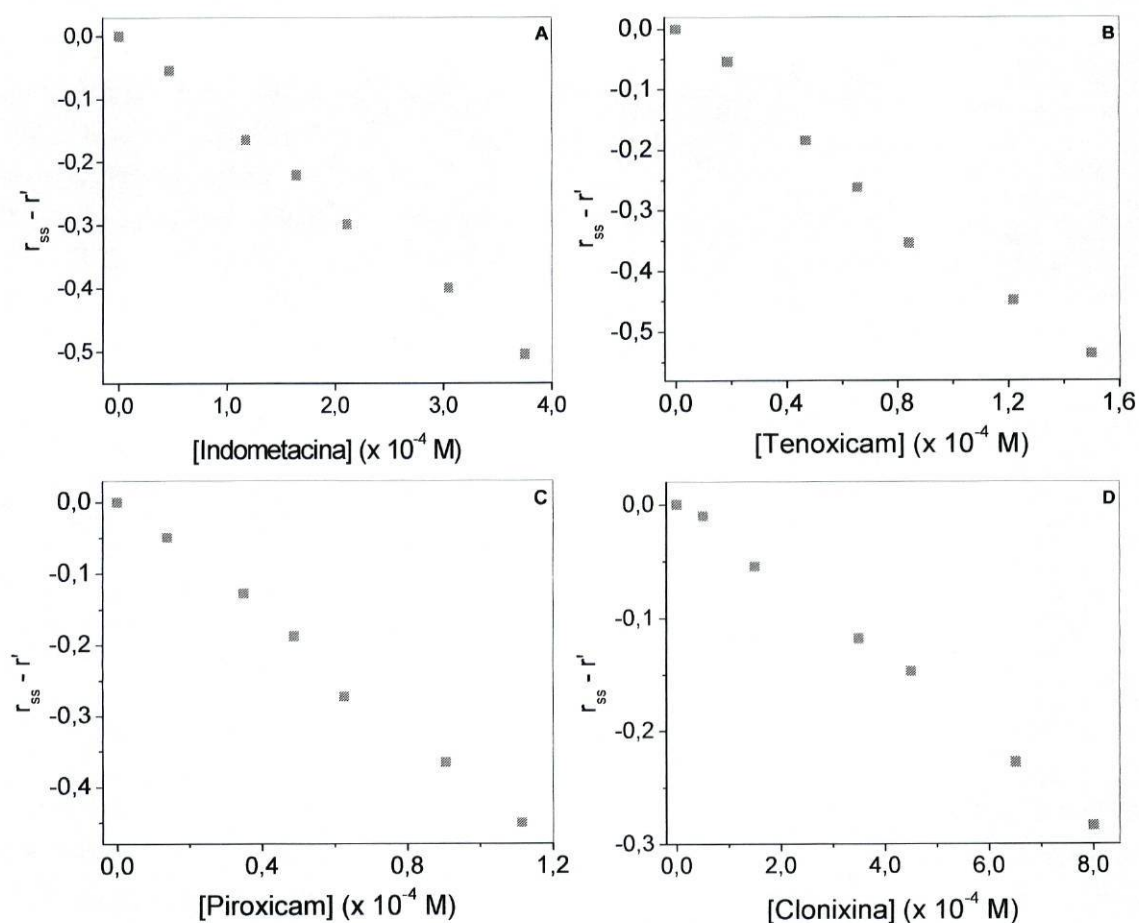


Figura 5.4: Diferença de r_{ss} e r' obtida na presença da sonda DPH incorporada em membranas de esplenócitos (1×10^6 céls/mL) e de concentrações crescentes de indometacina (A), tenoxicam (B), piroxicam (C) e clonixina (D), a pH igual a 7,4.

A Tabela 5.1 contém os valores de anisotropia de estado estacionário obtidos experimentalmente, r_{ss} , e os respectivos valores corrigidos, r' , para o diclofenac, indoprofeno e etodolac.

Como é possível observar na Tabela 5.1, tanto os valores de r_{ss} experimentais como os valores de r' mantiveram-se praticamente constantes em todo o intervalo de concentrações usado para o diclofenac, indoprofeno e etodolac.

O efeito observado para os diferentes AINEs está de acordo com os resultados obtidos nos ensaios efectuados com LUVs de EPC. De facto, também nos estudos com lipossomas a clonixina, a indometacina [43], o piroxicam e o tenoxicam demonstraram capacidade de fluidificação da membrana, o indoprofeno não apresentava essa capacidade nos diferentes graus de profundidade da bicamada, enquanto que o diclofenac também não era capaz de alterar a fluidez membranas a nível da parte mais profunda da bicamada (próximo das sondas 12-AS e DPH [22]).

Relativamente ao etodolac, os resultados são também concordantes, pois este AINE demonstrou apenas uma pequena eficácia de fluidificação, nos ensaios realizados com lipossomas.

Tabela 5.1: Valores da anisotropia de estado estacionário, r_{ss} e da anisotropia corrigida, r' , obtidos com o aumento da concentração ([Q]) do diclofenac, indoprofeno e etodolac em membranas de esplenócitos, a pH igual a 7,4.

AINEs	[Q] ($\times 10^{-4}$ M)	r_{ss}	r'
Diclofenac	0	0,243	0,243
	0,50	0,243	0,245
	1,50	0,233	0,242
	3,50	0,239	0,246
	4,50	0,235	0,252
	6,50	0,240	0,239
	8,00	0,237	0,239
Indoprofeno	0	0,207	0,207
	0,40	0,206	0,206
	1,20	0,205	0,202
	2,81	0,205	0,212
	3,61	0,202	0,211
	5,21	0,205	0,212
	6,41	0,203	0,209
Etodolac	0	0,210	0,210
	0,89	0,211	0,206
	2,24	0,206	0,200
	3,14	0,205	0,205
	4,03	0,208	0,206
	5,82	0,208	0,199
	7,17	0,207	0,215

O efeito de fluidificação em percentagem $[(r' - r_{ss})/r_0] \times 100$, obtido para cada um dos fármacos em estudo, é apresentado na Figura 5.5.

As diferenças de eficácia dos compostos estudados no aumento da fluidez da membrana reflectiram-se no valor dos seus IC_{50} , os quais são definidos como a concentração de cada composto requerida para aumentar o efeito de fluidificação em 50% (Tabela 5.2).

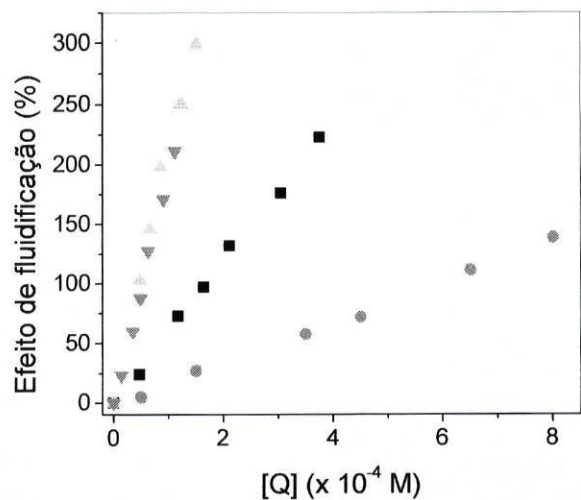


Figura 5.5: Efeito de fluidificação (%) obtido para a sonda DPH incorporada em membranas de esplenócitos (1×10^6 céls/mL), na presença de concentrações crescentes de indometacina (■), tenoxicam (▲), piroxicam (▼) e clonixina (●), a pH igual a 7,4.

Tabela 5.2: Concentração (M) de cada AINE requerida para aumentar o efeito de fluidificação em 50% (IC_{50}) em membranas de esplenócitos (1×10^6 céls/mL), a pH igual a 7,4. Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão dos resultados obtidos em três ensaios independentes.

AINEs	IC ₅₀
Clonixina	$2,91 \times 10^{-4} \pm 1,41 \times 10^{-6}$
Indometacina	$8,89 \times 10^{-5} \pm 6,65 \times 10^{-6}$
Piroxicam	$2,70 \times 10^{-5} \pm 2,97 \times 10^{-6}$
Tenoxicam	$2,24 \times 10^{-5} \pm 5,66 \times 10^{-7}$
Diclofenac	— *
Indoprofeno	— *
Etodolac	— *

*sem efeito

Como se pode concluir, pela observação da Tabela 5.2, a ordem de eficácia dos compostos na fluidificação membranas é a seguinte: tenoxicam > piroxicam > indometacina > clonixina. O diclofenac, o indoprofeno e o etodolac não mostraram

capacidade para induzir modificações na microviscosidade das membranas, não tendo sido possível, deste modo, o cálculo dos seus IC₅₀.

5.4.2. Avaliação da actividade antioxidante dos AINEs face à peroxidação lipídica induzida pelos radicais ROO[•]

A avaliação da actividade antioxidante do diclofenac não foi possível neste estudo, pois ocorria precipitação no sistema reaccional aquando da adição do indutor AAPH, de modo análogo ao que se verificou neste tipo de ensaios com LUVs.

O ensaio controlo relativo aos esplenócitos contendo a sonda fluorescente DPH-PA incorporada nas suas membranas, na ausência do oxidante e dos compostos em estudo, apresentou valores de intensidade de fluorescência, assim como de anisotropia muito constantes durante todo o curso do ensaio. O mesmo perfil foi obtido nos ensaios controlo efectuados para os AINEs e trolox, enquanto que no branco ou ensaio controlo de peroxidação houve um decréscimo ou um aumento significativo da intensidade de fluorescência da sonda DPH-PA ou rigidificação da membrana, respectivamente.

A actividade antioxidante apresentada pelos AINEs clonixina, indoprofeno, piroxicam, tenoxicam e etodolac pode ser facilmente visualizada pela comparação do decréscimo da intensidade de fluorescência ou do aumento da anisotropia (rigidificação da membrana), na presença de diferentes concentrações de anti-inflamatório, relativamente ao controlo de peroxidação. Na Figura 5.6 é possível observar que os anti-inflamatórios clonixina e indoprofeno foram praticamente ineficazes na inibição da peroxidação lipídica quer pelas determinações de fluorescência, quer pelas determinações de anisotropia, independentemente das concentrações utilizadas, uma vez que, para todas as concentrações ensaiadas, o perfil obtido da diminuição da intensidade de fluorescência/aumento de anisotropia foi semelhante ao obtido para o controlo da peroxidação.

Os restantes AINEs em estudo, assim como o trolox, usado como antioxidante de referência, mostraram ser capazes de proteger a sonda da oxidação pelos radicais peroxilo, de um modo dependente da concentração, quer pelas determinações da intensidade de fluorescência, quer pelas de anisotropia de fluorescência. Nas Figuras 5.7 e 5.8 apresenta-se o comportamento obtido para os AINEs etodolac, piroxicam e

tenoxicam e para o antioxidante de referência face aos radicais $\text{ROO}^{\bullet}$ gerados na fase aquosa.

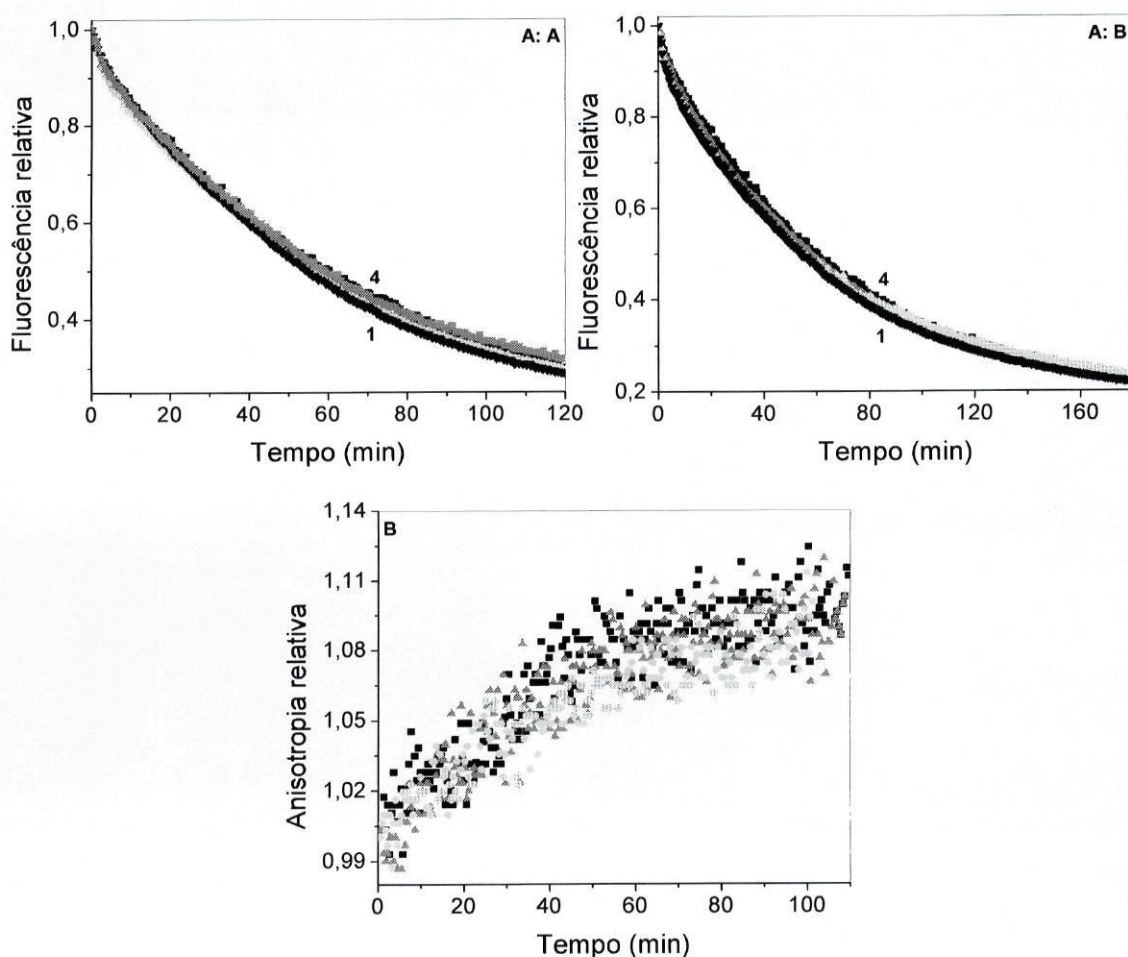


Figura 5.6 A: Fluorescência relativa observada durante a peroxidação das membranas de esplenócitos, com a sonda DPH-PA incorporada, induzida pelo AAPH, a 37° C, e perante a adição de diferentes concentrações de clonixina (A: (1) 0; (2) 55; (3) 111; (4) 222 μM) e indoprofeno (B: (1) 0; (2) 24; (3) 85; (4) 170 μM). B: Comparação da anisotropia relativa obtida nas mesmas condições descritas para A, para o ensaio controlo da peroxidação (■) e na presença dos AINEs clonixina (●; 222 μM) e indoprofeno (▲; 170 μM).

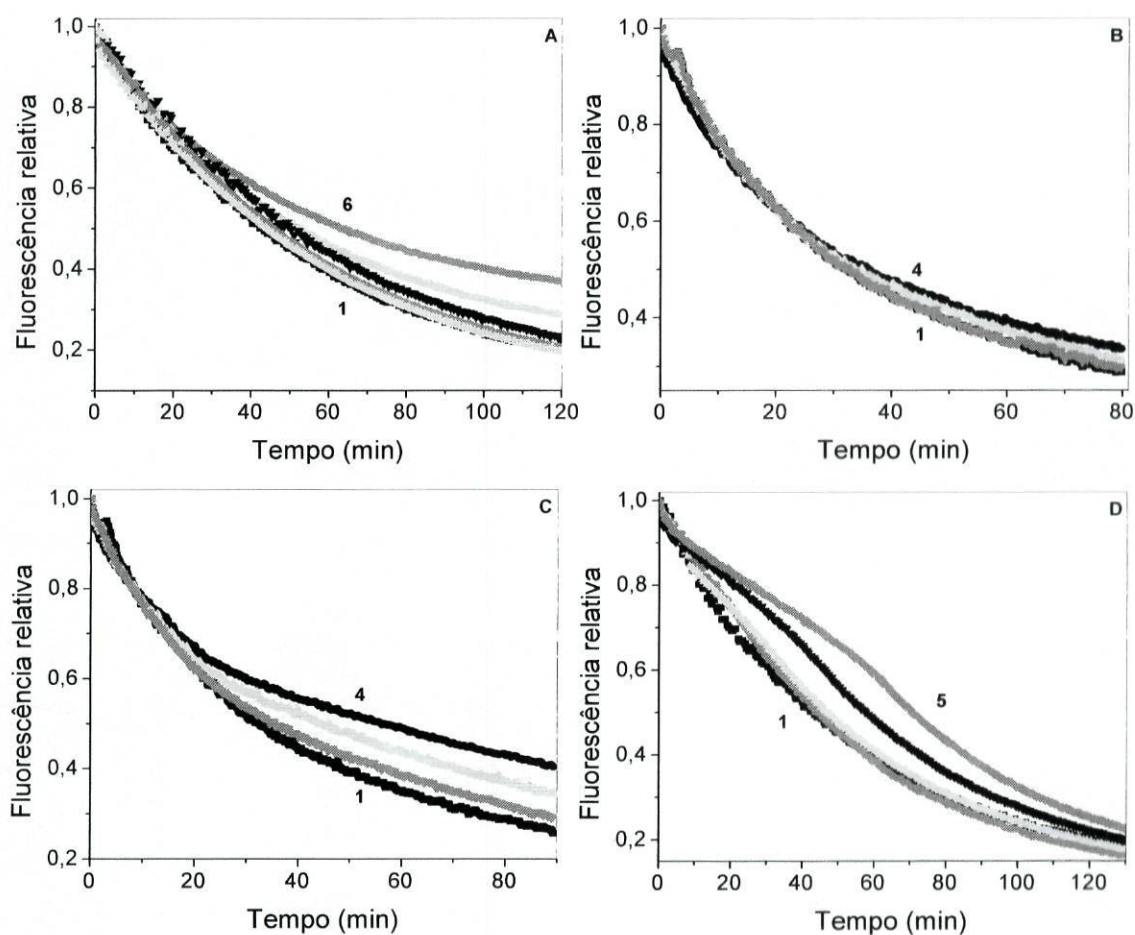


Figura 5.7: Fluorescência relativa observada durante a peroxidação das membranas de esplenócitos, com a sonda DPH-PA incorporada, induzida pelo AAPH, a 37°C, e perante a adição de diferentes concentrações de etodolac (A; (1) 0; (2) 5; (3) 10; (4) 21; (5) 84; (6) 169 μM), piroxicam (B: (1) 0; (2) 12; (3) 25; (4) 50 μM), tenoxicam (C: (1) 0; (2) 27; (3) 53; (4) 106 μM) e trolox (D; (1) 0; (2) 2; (3) 5; (4) 9; (5) 18 μM).

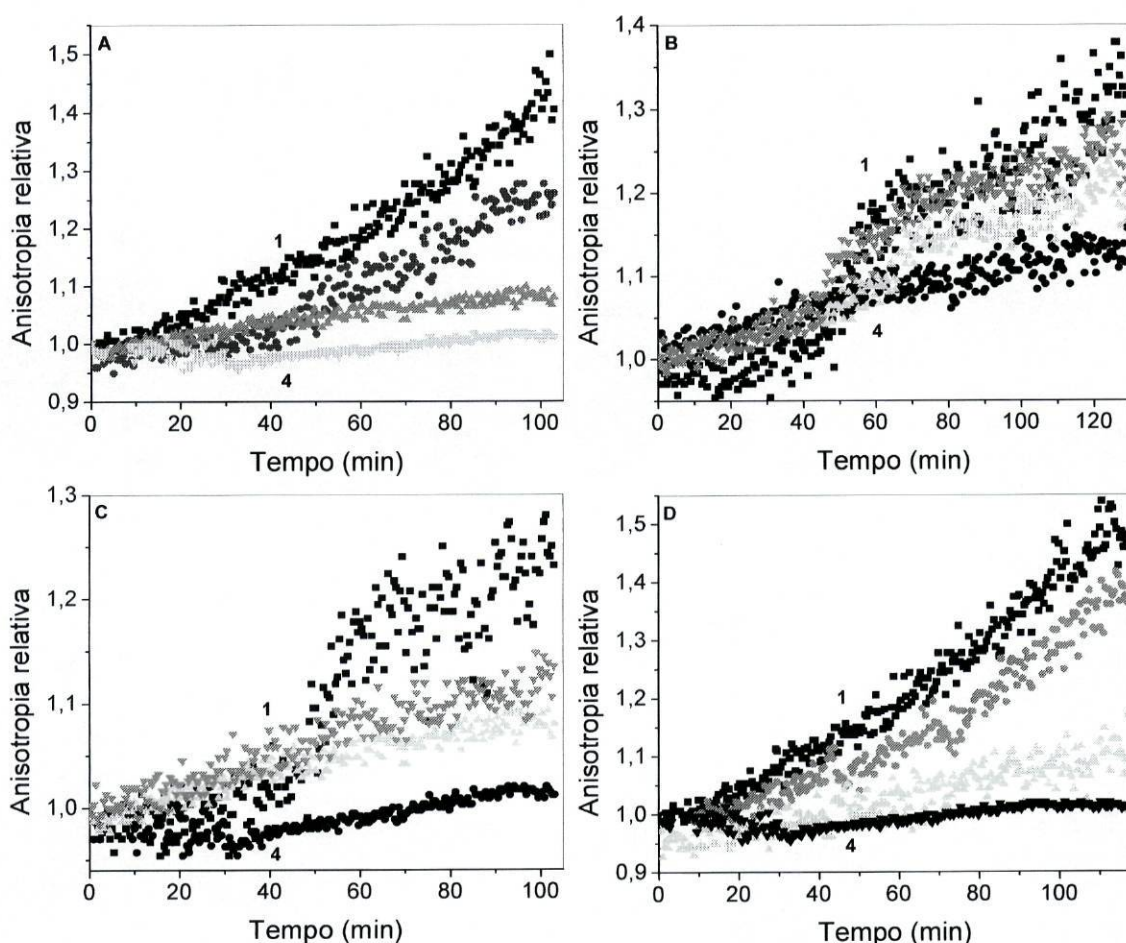


Figura 5.8: Anisotropia relativa observada durante a peroxidação das membranas de esplenócitos, com a sonda DPH-PA incorporada, induzida pelo AAPH, a 37° C, e perante a adição de diferentes concentrações de etodolac (A; (1) 0; (2) 21; (3) 84; (4) 169 μ M), piroxicam (B: (1) 0; (2) 12; (3) 25; (4) 50 μ M), tenoxicam (C: (1) 0; (2) 27; (3) 53; (4) 106 μ M) e trolox (D; (1) 0; (2) 5; (3) 9; (4) 18 μ M).

Embora não seja tão evidente como nos estudos efectuados com LUVs, principalmente nos resultados obtidos para a anisotropia de fluorescência (Figura 5.8), se se observarem os perfis obtidos nos decréscimos da intensidade de fluorescência, também se pode concluir que os AINEs não retardaram o decaimento da intensidade de fluorescência (Figura 5.7), mas alteraram a cinética da peroxidação, que não ocorreu até à perda total de fluorescência da sonda DPH-PA obtida no ensaio apenas com o iniciador da peroxidação, mas houve uma estabilização desse efeito mais cedo do que o que ocorreu no ensaio controlo de peroxidação.

A eficácia dos AINEs estudados e do trolox pode ser comparada e ordenada tendo em conta os seus valores de IC_{15} (concentração de cada composto necessária para que a razão referida apresente um valor de 15%) obtidos pelas rectas de

regressão geradas na representação gráfica da razão $(AUC_{\text{AINE/Trolox}} - AUC_{\text{AAPH}})/AUC_{\text{AAPH}}$ ou $(AUC_{\text{AAPH}} - AUC_{\text{AINE/Trolox}})/AUC_{\text{AAPH}}$ versus concentração usada para cada um dos fármacos e para o antioxidante de referência, nos ensaios de fluorescência e de anisotropia de fluorescência, respectivamente (Figura 5.9). Na Tabela 5.3 estão incluídos os valores de IC_{15} obtidos para cada um dos AINEs e para o antioxidante de referência trolox.

Pela análise da Tabela 5.3 e da Figura 5.9, é possível ordenar os compostos em termos de eficácia, para ambos os estudos de fluorescência e de anisotropia de fluorescência, do seguinte modo: trolox > etodolac > tenoxicam > piroxicam. Assim, os resultados apresentados estão de acordo com os resultados obtidos nas bicamadas lipídicas de lipossomas de EPC.

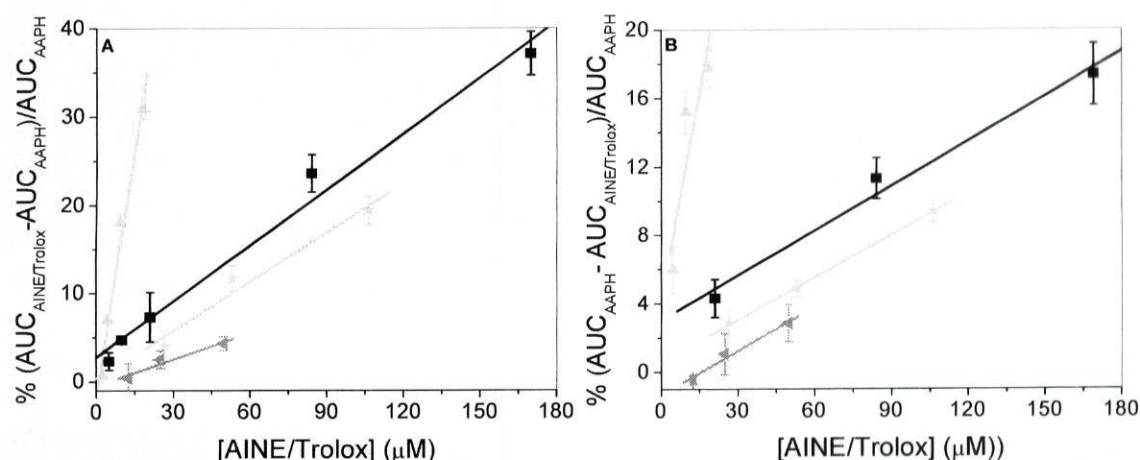


Figura 5.9: Regressão linear entre a percentagem da razão $(AUC_{\text{AINE/Trolox}} - AUC_{\text{AAPH}})/AUC_{\text{AAPH}}$ e $(AUC_{\text{AAPH}} - AUC_{\text{AINE/Trolox}})/AUC_{\text{AAPH}}$ e as concentrações usadas de AINEs e trolox, obtidas, respectivamente, no estudo de decaimento da intensidade de fluorescência (A) e aumento da anisotropia (B). (Δ) tenoxicam; ($\blacktriangle$) piroxicam; ($\blacksquare$) etodolac; e ($\circ$) trolox. Os valores da razão referida foram calculados a partir dos resultados de três experiências (média $\pm$ desvio padrão).

Tabela 5.3: Valores de IC₁₅ ($\pm$ desvio padrão) obtidos para o trolox e AINEs estudados em três ensaios independentes de fluorescência e de anisotropia para a avaliação da actividade antioxidante pela sonda DPH-PA, a partir da equação das rectas de regressão das representações gráficas $\%(AUC_{AINE/Trolox}-AUC_{AAPH})/AUC_{AAPH}$ ou $(AUC_{AAPH}-AUC_{AINE/Trolox})/AUC_{AAPH}$ versus concentração dos respectivos compostos.

Compostos	IC ₁₅	
	Fluorescência	Anisotropia
Indoprofeno	_____*	_____*
Clonixina	_____*	_____*
Etodolac	58,0 $\pm$ 3,9	137,3 $\pm$ 10,3
Piroxicam	n.a.**	n.a.**
Tenoxicam	79,8 $\pm$ 5,0	n.a.**
Trolox	9,0 $\pm$ 1,4	13,2 $\pm$ 3,5

*sem actividade
**não atinge

5.5. CONCLUSÃO

O conjunto de resultados obtidos nos estudos de fluidez membranar e de avaliação da actividade antioxidante dos AINEs na peroxidação lipídica induzida pelos radicais peroxilo são concordantes com os obtidos em lipossomas usados como modelos membranares. De facto, em ambos os estudos, os AINEs, de uma maneira geral, mostraram capacidade para aumentar a fluidez das membranas e de inibição da peroxidação lipídica. Por este motivo, os estudos referidos constituem uma importante ferramenta na análise *in vitro*. Adicionalmente, o exposto mostra que os estudos *in vitro* com lipossomas unilamelares de EPC representam uma mais valia, pois é possível, através de sistemas mais facilmente manuseáveis, prever o que poderá ocorrer *in vivo*. Contudo, deve-se ter sempre presente as limitações de tal correlação. Com efeito, estes estudos não evitam a necessidade da realização de ensaios em sistemas biológicos reais, os quais são pouco abundantes na literatura.

Os resultados obtidos no estudo efectuado para avaliar as alterações da fluidez membranar resultantes da interacção fármaco/membrana mostraram que os anti-inflamatórios clonixina, indometacina, piroxicam e tenoxicam foram capazes de

diminuir a microviscosidade das membranas de uma forma dependente da concentração. Para os AINEs diclofenac, etodolac e indoprofeno não se observou qualquer influência na propriedade física sob estudo, nas condições experimentais utilizadas. De todos os AINEs testados, o tenoxicam foi o que induziu uma maior perturbação do estado físico da membrana considerado.

As conclusões obtidas no estudo de anisotropia diferiram, contudo, das de outros autores, que estudaram o efeito da indometacina em modelos das membranas celulares preparados a partir de homogeneizados tecidulares [7, 13]. Com efeito, esses autores deduziram que o fármaco referido tinha um efeito estabilizante das membranas, ao contrário dos resultados aqui apresentados. Estas conclusões antagónicas estão relacionadas com o tratamento dos resultados obtidos no estudo da anisotropia de estado estacionário. De facto, a interpretação dos resultados, pelos autores acima mencionados, foi feita simplesmente pela observação do aumento dos valores de anisotropia experimentais (r_{ss}). Assim, é necessário ter atenção na interpretação dos resultados obtidos com sondas fluorescentes apresentados na literatura, uma vez que a sonda, por si mesma, influencia consideravelmente os resultados, pela variação do seu tempo de vida no estado excitado.

Finalmente, o estudo efectuado para avaliar a actividade antioxidante dos AINEs face ao radical peroxilo revelou que, ao contrário do indoprofeno e da clonixina, todos os outros fármacos demonstraram capacidade para inibir a propagação da peroxidação lipídica, de um modo dependente da concentração. O AINE que apresentou maior eficácia antioxidante foi o etodolac, apesar do tenoxicam ter-se revelado o mais eficaz em fluidificar a membrana. Com efeito, tendo em conta a existência de uma relação entre a capacidade dos compostos alterarem a fluidez da membrana e a proporção de peroxidação lipídica sugerida por vários autores [18, 19], poderia-se pensar que o tenoxicam deveria ser o mais eficaz. Com efeito, encontra-se na literatura vários exemplos de compostos que apresentam actividade antioxidante apenas pela modificação das propriedades físico-químicas das membranas [3, 20, 26, 44]. Contudo, quando os radicais são gerados na fase aquosa, a prevenção do ataque inicial dos radicais às membranas celulares representa um papel essencial na defesa antioxidante das biomembranas, pois a peroxidação lipídica, uma vez iniciada, é uma reacção autocatalítica. De facto, é do conhecimento geral que apenas uma espécie reactiva de oxigénio pode provocar a conversão de centenas de ácidos gordos em hidroperóxidos lipídicos, ou seja, após a formação de um radical alquilo pelo radical livre ocorrem uma série de reacções que originam novas espécies radicalares capazes

de iniciar novos processos de peroxidação [36, 45]. Deste modo, há todo o interesse que um antioxidante seja capaz de impedir a iniciação da peroxidação lipídica. Assim, apesar do etodolac não ser tão lipossolúvel como os oxicamos e ser incapaz de provocar uma alteração significativa da fluidez membranar apresenta-se muito eficaz na captura dos radicais livres gerados na fase aquosa, como demonstrado noutros estudos efectuados para a elaboração desta dissertação e presentes na literatura [30].

Os estudos efectuados, nomeadamente a influência dos AINEs na fluidez da membrana e a avaliação da sua actividade antioxidante, são fundamentais para a compreensão do mecanismo de acção destes fármacos. Por um lado, as modificações do estado físico da bicamada lipídica das membranas provocam alterações da actividade de enzimas membranares, dos receptores ligados à membrana e da permeabilidade dos canais de iões responsáveis pela homeostasia das células [5], que podem contribuir ou serem mesmo os reponsáveis por determinados efeitos terapêuticos. E, por outro lado, a actividade antioxidante apresentada pelos AINEs poderá constituir um mecanismo de acção que actue sinergicamente com os seus reconhecidos efeitos de inibição da actividade das enzimas ciclooxigenase e lipoxigenase [46, 47], pela prevenção da propagação e da perpetuação dos danos oxidativos nos tecidos, nas reacções inflamatórias agudas e crónicas *in vivo*. De facto, há uma crescente evidência que as espécies reactivas de oxigénio e os resultantes danos oxidativos estão envolvidas na origem ou agravamento de diversas doenças inflamatórias e degenerativas [48].

5.6. BIBLIOGRAFIA

1. Manson, R. P., Rhodes, D. G., Herbette, L. G. (1991). Reevaluating equilibrium and kinetic binding parameters for lipophilic drugs based on a structural model for drug interaction with biological membranes. *J. Med. Chem.*, 34: 869-877.
2. Cervato, G., Viani, P., Masserini, M., Di Iorio, C., Cestaro, B. (1988). Studies on peroxidation of arachidonic acid in different liposomes below and above phase transition temperature. *Chem. Phys. Lipids*, 49: 135-139.
3. Wiseman, H., Cannon, M., Arnestein, H. R. V., Barlow, D. J. (1992). The structural mimicry of membrane sterols by tamoxifen: evidence from cholesterol coefficients and molecular-modelling for its action as a membrane anti-oxidant and anti-cancer agent. *Biochim. Biophys. Acta*, 138: 197-202.
4. Facino, R. M., Carini, M., Aldini, G., Saibene, L., Macciocchi, A. (1993). Antioxidant profile of nimesulide, indomethacin and diclofenac in phosphatidylcholine liposomes (PCL) as membrane model. *Int. J. Tissue React.*, 15: 225-234.
5. Horan, K. L., Lutzke, B. S., Cazars, A. R., McCall, J. M., Epps, D. E. (1994). Kinetic evaluation of lipophilic inhibitors of lipid peroxidation in DLPC liposomes. *Free Rad. Biol. Med.*, 17: 587-596.
6. Takayama, F., Egashira, T., Yamanaka, Y. (1994). Effect of diclofenac, a non-steroidal anti-inflammatory drug, on lipid peroxidation caused by ischemia-reperfusion in rat liver. *Jpn. J. Pharmacol.*, 64: 71-78.
7. Knazek, R. A., Liu, S. C., Dave, J. R., Christy, R. J., Keller, J. A. (1981). Indomethacin causes a simultaneous decrease of both prolactin binding and fluidity of mouse liver membranes. *Prostag. Med.*, 6: 403-411.
8. Simonetti, O., Ferretti, G., Offidani, A. M., Gervasi, P., Curatola, G., Bossi, G. (1996). Plasma membrane fluidity of keratinocytes of normal and psoriatic skin: A study using fluorescence anisotropy of trimethylammoniumdiphenylhexatriene (TMA-DPH). *Arch. Dermatol. Res.*, 288: 51-54.
9. Beccerica, E., Ferretti, G., Curatola, G., Cervini, C. (1990). Diacetylrrhein and rhein: in vivo and in vitro effect on lymphocyte membrane fluidity. *Pharmacol. Res.*, 22: 277-285.
10. Beccerica, E., Piergiacomini, G., Curatola, G., Ferretti, G. (1989). Effect of antirheumatic drugs on lymphocyte membrane fluidity in rheumatoid arthritis: a fluorescence polarization study. *Pharmacology*, 38: 16-22.

11. Lehr, H. A., Zimmer, J. P., Hubner, C., Reisinger, E. C., Kohlschutter, A., Schmitz, H. (1991). Dextran sulphate reduces diphenylhexatriene anisotropy in human peripheral blood lymphocytes: Impact on plasma membrane fluidity and HIV-cytopathogenicity. *J. Antimicrob. Chemother.*, 28: 677-680.
12. Clarke, R., Van den Berg, H. W., Murphy, R. F. (1990). Reduction of the membrane fluidity of human breast cancer cells by tamoxifen and 17 beta-estradiol. *J. Natl. Cancer Inst.*, 82: 1702-1705.
13. Dave, J. R., Witorsch, R. J. (1983). Indomethacin decreases both luteinizing hormone binding and fluidity of testicular microsomal membranes in rat. *Prostag. Leukotr. Med.*, 12: 371-380.
14. Wiseman, H., Smith, C., Halliwell, B., Cannon, M., Arnstein, H. R. V., Lennard, M. S. (1992). Droloxifene (3-hydroxytamoxifen) has membrane antioxidant ability: Potencial relevance to its mechanism of therapeutic action in breast cancer. *Cancer Lett.*, 66: 61-68.
15. Wiseman, H., Quinn, P., Halliwell, B. (1993). Tamoxifen and related compounds decrease membrane fluidity in liposomes. *FEBS Lett.*, 330: 53-56.
16. Engelke, M., Bojarski, P., Blob, R., Diehl, H. (2001). Tamoxifen perturbs lipid bilayer order and permeability: Comparison of DSC, fluorescence anisotropy, Laurdan generalized polarization, and carboxyfluorescein leakage studies. *Biophys. Chem.*, 90: 157-173.
17. Castelli, F., Trombetta, D., Tomaino, A., Bonina, F., Romeo, G., Uccella, N., Saija, A. (1997). Dipalmitoylphosphatidylcholine/linoleic acid mixed unilamellar vesicles as model membranes for studies on novel free-radical scavengers. *J. Pharmacol. Toxicol.*, 37: 135-141.
18. Barros, M. P., Pinto, E., Colepicolo, P., Pedersén, M. (2001). Astaxanthin and peridinin inhibit oxidative damage in Fe²⁺-loaded liposomes: scavenging oxyradicals or changing membrane permeability? *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 288: 225-232.
19. McLean, L. R., Hagaman, K. A. (1992). Effect of lipid physical state on the rate of peroxidation of liposomes. *Free Rad. Biol. Med.*, 12: 113-119.
20. Wiseman, H., Cannon, M., Arnstein, H. R. V., Halliwell, B. (1990). Mechanism of inhibition of lipid peroxidation by tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen introduced into liposomes. *FEBS Lett.*, 274: 107-110.

21. Gaudio, M. C., Valvo, L., Bertocchi, P., Manna, L. (2003). RP-HPLC study of the degradation of diclofenac and piroxicam in the presence of hydroxyl radicals. *J. Pharmaceut. Biomed.*, 32: 151-158.
22. Kaiser, R. D., London, E. (1998). Location of diphenylhexatriene (DPH) and its derivatives within membranes: comparison of different fluorescence quenching analysis of membrane depth. *Biochemistry*, 37: 8180-8190.
23. Shinitzky, M., Barenholz, Y. (1978). Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization. *Biochim. Biophys. Acta*, 515: 367-394.
24. Shinitzky, M., Inbar, M. (1976). Microviscosity parameters and protein mobility in biological membranes. *Biochem. Biophys. Acta*, 433: 133-149.
25. Gutiérrez, M. E., García, A. F., Africa de Mandariaga, M., Sagrista, M. L., Casadó, F. J., Mora, M. (2003). Interaction of tocopherols and phenolic compounds with membrane lipid components: evaluation of their antioxidant activity in a liposomal model system. *Life Sci.*, 72: 2337-2360.
26. Wiseman, H. (1993). Vitamin D is a membrane antioxidant. *Fed. Eur. Biochem. Soc.*, 326: 285-288.
27. Cao, G., Prior, R. L. (1998). Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin. Chem.*, 44: 1309-1315.
28. Zwart, L. L., Meerman, J. H. N., Commandeur, J. N. M., Vermeulen, N. P. E. (1999). Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Rad. Biol. Med.*, 26: 202-226.
29. Zoete, V., Bailly, F., Maglia, F., Rougée, M., Bensasson, R. V. (1999). Molecular orbital theory applied to the study of nonsteroidal anti-inflammatory drug efficiency. *Free Rad. Biol. Med.*, 26: 1261-1268.
30. Fernandes, E., Costa, D., Toste, S. A., Lima, J. L. F. C., Reis, S. (2004). In vitro scavenging activity for reactive oxygen and nitrogen species by nonsteroidal anti-inflammatory indole, pyrrole, and oxazole derivative drugs. *Free Rad. Biol. Med.*, 37: 1895-1905.
31. Fernandes, E., Toste, S. A., Lima, J. L. F. C., Reis, S. (2003). The metabolism of sulindac enhances its scavenging activity against reactive oxygen and nitrogen species. *Free Rad. Biol. Med.*, 35: 1008-1017.
32. Aikens, J., Dix, T. A. (1993). Hydrodioxyl (perhydroxyl), peroxy, and hydroxyl radical-initiates lipid peroxidation of large unilamellar vesicles (liposomes): comparative and mechanistic studies. *Arch. Biochem. Biophys.*, 305: 516-525.

33. Massaeli, H., Sobrattee, S., Pierce, G. N. (1999). The importance of lipid solubility in antioxidants and free radical generating systems for determining lipoprotein peroxidation. *Free Rad. Biol. Med.*, 26: 1524-1530.
34. Giamarellos-Bourboulisa, E. J., Tzivras, M., Kourtesas, D., Arnaoutis, T. P., Delladatsima, I., Dionyssiou-Asteriou, A., Davaris, P., Vafiadis-Zouboulis, I., Archimandritis, A. (2003). Lipid peroxidation in chronic gastritis; any influence of *Helicobacter pylori*? *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 68: 257-261.
35. Narushima, S., Spitz, D. R., Oberley, L. W., Toyokuni, S., Miyata, T., Gunnett, C. A., Buettner, G. R., Zhang, J., Ismail, H., Lynch, R. G., Berg, D. J. (2003). Evidence for oxidative stress in NSAID-induced colitis in IL10/mice. *Free Rad. Biol. Med.*, 34: 1153-1166.
36. Terao, J., Piskula, M. K. (1998). Flavonoids as inhibitors of lipid peroxidation in membranes. In: Rice-Evans CA, Packer L (eds) *Flavonoids in Health and Disease*. Marcel Dekker New York: 277-293.
37. Tricerri, M. A., Garda, H. A., Brenner, R. R. (1994). Lipid chain order and dynamics at different bilayer depths in liposomes of several phosphatidylcholines studied by differential polarized phase fluorescence. *Chem. Phys. Lipids*, 71: 61-72.
38. Lacowicz, J. R. (1999). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 2nd ed. Kluwer Academic/ Plenum Press. New York.
39. Huang, D., Boxin, O., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., Prior, R. L. (2002). High-Throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using a Multichannel Liquid Handling System Coupled with a Microplate Fluorescence Reader in 96-Well Format. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 4437-4444.
40. Coutinho, A., Prieto, M. (1993). Ribonuclease T1 and alcohol dehydrogenase fluorescence quenching by acrylamide. *J. Chem. Educ.*, 70: 425-428.
41. Cordeiro-da-Silva, A., Tavares, J., Araujo, N., Cerqueira, F., Tomas, A., Kong Thoo Lin, P., Ouaisi, A. (2004). Immunological alterations induced by polyamine derivatives on murine splenocytes and human mononuclear cells. *Int. Immunopharmacol.*, 4: 547-556.
42. Cabrini, G., Verkman, A. S. (1986). Localization of cyanine dye binding to brush-border membranes by quenching of *n*-(9-anthroyloxy) fatty acid probes. *Biochim. Biophys. Acta*, 862: 285-293.
43. Lúcio, M., Ferreira, H., Lima, J. L. F. C., Matos, C., Castro, B., Reis, S. (2004). Influence of some anti-inflammatory drugs in membrane fluidity studied by

- fluorescence anisotropy measurements. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 6: 1493-1498.
44. Patel, R. P., Boersma, B. J., Crawford, J. H., Hogg, N., Kirk, M., Kalyanaraman, B., Parks, D. A., Barnes, S., Darley-Usmar, V. (2001). Antioxidant mechanisms of isoflavones in lipid systems: paradoxical effects of peroxy radical scavenging. *Free Rad. Biol. Med.*, 31: 1570-1581.
 45. Lasic, D. D. (1993). *Liposomes - from Physics to Applications*. Elsevier. New York.
 46. Vane, J. R. (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature*, 231: 232-235.
 47. Kitchen, E. A., Dawson, W., Rainsford, K. D., Cawston, T. (1985). *Anti-inflammatory and anti-rheumatic drugs*. CRC Press. Boca Raton.
 48. Ghiselli, A., Serafini, M., Natella, F., Scaccini, C. (2000). Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Rad. Biol. Med.*, 29: 1106-1114.

CAPÍTULO 6

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

CAPÍTULO 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Neste capítulo são apresentadas algumas considerações finais resultantes da análise das conclusões de cada trabalho realizado na elaboração da presente dissertação.

O principal objectivo do trabalho realizado centrou-se no estudo da interacção dos AINEs diclofenac, clonixina, etodolac, indoprofeno, piroxicam e tenoxicam com lipossomas, usados como modelos membranares, bem como a sua localização membranar e actividade antioxidante. Alguns estudos realizados com vesículas lipossómicas foram também executados na presença de esplenócitos, nomeadamente a determinação da influência dos AINEs na fluidez membranar e a actividade antioxidante face a radicais peróxido gerados na fase aquosa. Estes últimos estudos foram realizados para validar os resultados obtidos com lipossomas e, de facto, mostraram que o comportamento dos fármacos, na presença de membranas celulares ou lipossomas, apresenta uma tendência semelhante. Deste modo, mais uma vez se verifica que os lipossomas constituem ferramentas valiosas para o estudo da interacção de fármacos com as membranas.

Inicialmente, foi quantificada a interacção fármaco/lipossoma pela determinação do coeficiente de partição, que fornece uma indicação da lipofilia dos AINEs e da sua capacidade para penetrar no interior e/ou passar através das membranas. Os resultados obtidos pelas diversas metodologias descritas, utilizando lipossomas unilamelares de EPC, sem ou com a inclusão de colesterol na sua constituição, estão sumariados na Tabela 6.1. As metodologias independentes utilizadas para a determinação do coeficiente de partição dos AINEs estudados permitiram comparar os resultados obtidos entre as mesmas e verificar a tendência dos anti-inflamatórios para a interacção com as membranas celulares.

Tabela 6.1: Resumo dos valores de coeficiente de partição do diclofenac, clonixina, piroxicam, tenoxicam, etodolac e indoprofeno obtidos com lipossomas unilamelares de EPC, contendo ou não colesterol, por diversas metodologias, a 25°C.

AINEs	Espectrofotometria derivativa					Desactivação de fluorescência (EPC)	Potencial-zeta (EPC)
	EPC			EPC + 10% colesterol	EPC + 40% colesterol		
	pH 3,0	pH 7,4	pH 10,3	pH 7,4	pH 7,4	pH 7,4	pH 7,4
Diclofenac	26000	1200	1100	870	300	1170	1070
Clonixina	530	660	870	590	270	670	580
Piroxicam		2700				2680	
Tenoxicam		2300				2320	
Etodolac		—					
Indoprofeno		—					

Pela observação da Tabela 6.1, é possível verificar que os resultados obtidos pelos diversos métodos, a um valor de pH igual a 7,4, foram semelhantes. Atendendo à diferença das constantes de acidez dos AINEs estudados, as quais foram determinadas quando não existia na literatura referência aos seus valores, é possível verificar que os valores de K_p obtidos apontam para uma interacção superior da forma neutra dos fármacos. Assim, o diclofenac, que existe predominantemente na forma neutra, a um valor de pH igual a 3,0, apresentou uma maior interacção com os lipossomas a esse valor de pH do que a valores de pH iguais a 7,4 e 10,3, nos quais se encontra praticamente todo ionizado. Relativamente à clonixina, é possível observar que a sua afinidade para as membranas lipídicas não variou drasticamente com a variação do valor de pH, uma vez que se encontra ionizada em todo o intervalo de pH considerado. Contudo, o menor valor de K_p a um valor de pH igual a 3,0 poderá dever-se às repulsões electrostáticas entre as formas de clonixina carregadas positivamente e a superfície membranar também positiva. Por outro lado, a análise dos resultados de K_p obtidos a um valor de pH igual a 7,4, para os AINEs diclofenac e clonixina, na presença de concentrações crescentes de colesterol em LUVs de EPC, permitiu verificar que ocorria uma diminuição da partição dos mesmos à medida que a concentração do colesterol nos lipossomas aumentava. Esta diminuição deve-se ao papel do colesterol nas membranas, que é justamente usado para reduzir a difusão dos fármacos nas vesículas.

Quanto aos oxicamos estudados, verificou-se que estes fármacos apresentam uma maior partição comparativamente à obtida para os AINEs anteriores, dado que são iões dipolares estáveis a um valor de pH igual a 7,4 e, consequentemente, mais hidrófobos que as formas carregadas negativamente do diclofenac e clonixina presentes maioritariamente a esse valor de pH.

Para o etodolac e o indoprofeno não foi possível a determinação do valor de K_p , nas condições experimentais estabelecidas. No que respeita ao etodolac, a inexistência de um valor de partição estará relacionada com as “elevadas” concentrações necessárias para se observar uma interacção significativa deste AINE com os lipossomas, que são superiores às concentrações utilizadas na realização dos ensaios espectrofotométricos para a determinação do valor de K_p . Relativamente ao indoprofeno, em todos os estudos efectuados nesta dissertação, não houve nenhum resultado que indiciasse uma possível interacção entre este derivado do ácido propiónico e as membranas.

Com base no exposto, a maior ou menor hidrossolubilidade ou lipossolubilidade dos AINEs estudados é dependente do valor de pH. Assim, o valor de pH da fase aquosa condiciona o grau de ionização de um determinado fármaco e, consequentemente, o coeficiente de partição, o qual, por sua vez, regula a capacidade dos compostos atravessarem a membrana.

Os estudos de desactivação de fluorescência de sondas fluorescentes permitiram não só a determinação dos coeficientes de partição, como também o estudo da localização dos fármacos estudados na membrana. Os resultados sugerem que os grupos carregados dos fármacos estabelecem interacções electrostáticas com os grupos colina e/ou fosfato da fosfatidilcolina, que funciona como âncora de fixação da molécula à membrana, enquanto que o resto da molécula se deve interdigitar por entre as caudas hidrofóbicas dos fosfolípidos. Deste modo, o diclofenac, a clonixina e o etodolac encontram-se, praticamente na sua totalidade, na forma negativa, a um valor de pH igual a 7,4, como referido anteriormente, e devem estabelecer interacções electrostáticas com o grupo colina carregado positivamente, enquanto que os oxicamos estudados, sendo iões dipolares estáveis a esse valor de pH, devem interagir electrostaticamente através dos seus grupos enol desprotonado, carregado negativamente, e piridina, carregado positivamente, com o grupo colina e o grupo fosfato, respectivamente. Foi ainda possível verificar que todos os AINEs referidos conseguem penetrar profundamente na membrana fosfolipídica, o que parece constituir um requisito importante para a actividade anti-inflamatória. Para o

indoprofeno não foi possível inferir acerca da sua localização na membrana, uma vez que não se observou desactivação de fluorescência, em todo o intervalo de concentrações usado na realização dos vários ensaios.

A avaliação do diâmetro, do potencial-zeta e da fluidez da membrana dos lipossomas permitiu verificar se a interacção AINE/membrana se traduzia em alterações na membrana do lipossoma. Assim, enquanto que a interacção de todos os AINEs estudados com os LUVs não conduziu a uma alteração do tamanho médio das vesículas, o mesmo não foi observado para o potencial-zeta e microviscosidade membranar.

A avaliação das propriedades electrostáticas da membrana na presença dos fármacos em estudo permitiu concluir que a interacção entre os AINEs diclofenac, clonixina e etodolac (para o tenoxicam, piroxicam e indoprofeno não se verificou uma descida significativa dos valores de potencial-zeta) e os lipossomas se traduzia numa clara alteração das propriedades eléctricas da membrana do lipossoma. Esta variação do potencial de membrana, para valores mais negativos, poderá ter consequências a nível biológico, metabólico e bioquímico, e ser, em última análise, responsável por muitos dos efeitos apresentados pelos fármacos.

Os estudos de anisotropia de fluorescência de estado estacionário, realizados para avaliar os efeitos dos AINEs na microviscosidade interna das membranas, mostraram que os AINEs tenoxicam, piroxicam, clonixina e etodolac apresentam capacidade para aumentar a fluidez membranar, enquanto que o diclofenac, pelo contrário, é capaz de provocar uma diminuição dessa e o indoprofeno parece não ter habilidade para provocar qualquer alteração ao nível da propriedade física da membrana em questão. A ordem de eficácia obtida na fluidificação membranar (tenoxicam > piroxicam > clonixina > etodolac) está de acordo com a extensão de partição determinada para cada AINE, pois um fármaco possuidor de um valor de K_p mais elevado terá maior capacidade de penetrar e perturbar a ordem dos lípidos circundantes. Os estudos de anisotropia de fluorescência realizados com as sondas *n*-AS (*n* = 2, 6, 9 e 12) também permitiram avaliar a influência de um determinado fármaco a diferentes profundidades da membrana. A clonixina e os oxicamos foram capazes de fluidificar a membrana em todos os graus de profundidade, enquanto que para o etodolac tais efeitos só foram observados ao nível da localização das sondas 12-AS e 9-AS. O diclofenac, por sua vez, apenas mostrou capacidade para enrigecer a membrana no local onde se situa a sonda 2-AS, não ocorrendo uma perturbação significativa da fluidez membranar a profundidades superiores.

A avaliação da actividade antioxidante dos anti-inflamatórios não esteróides consistiu na execução de um conjunto de ensaios *in vitro*, que permitiu estudar a capacidade destes compostos na prevenção da propagação e da perpetuação dos danos oxidativos nos tecidos, importantes na patogénese de diversas doenças, como a artrite reumatóide.

Os ensaios realizados na presença dos radicais estáveis do ABTS e do DPPH em solução etanólica, mostraram que os AINEs apresentavam diferentes eficácias antioxidantes de acordo com o radical presente em solução. Assim, nos ensaios efectuados com o radical ABTS^{•+}, verificou-se que o diclofenac, o etodolac, o tenoxicam e o piroxicam apresentavam actividade antioxidante, enquanto que a clonixina e o indoprofeno não possuíam efeito captador do radical ABTS^{•+} e, relativamente ao radical DPPH[•], apenas o tenoxicam e o piroxicam, os mais eficazes do ensaio anterior, mostraram capacidade captadora deste último radical. Por outro lado, no estudo realizado para avaliar a capacidade dos AINEs na prevenção da oxidação do ADN, apenas o etodolac e o tenoxicam foram capazes de reduzir a oxidação da base do ADN 2'-dG, pelos radicais hidroxilo, tendo-se mostrado o etodolac mais eficaz que o tenoxicam.

Na avaliação da actividade antioxidante dos AINEs pela sonda fluoresceína, na ausência ou na presença de LUVs de EPC, todos os anti-inflamatórios em estudo apresentaram efeito captador do radical ROO[•], de uma forma dependente da concentração, excepto o diclofenac, cuja eficácia antioxidante não foi possível determinar neste e nos outros ensaios efectuados com o AAPH, devido à formação de um precipitado quando, ao meio reaccional, se adicionava esse indutor. Em ambos os ensaios realizados com a sonda fluoresceína, a ordem de eficácia era a mesma se se considerasse as concentrações totais dos compostos adicionadas ao sistema reaccional. Contudo, se no estudo da avaliação da actividade antioxidante dos AINEs pela sonda fluoresceína na presença de LUVs de EPC, apenas a concentração na fase aquosa dos fármacos fosse tida em conta, a ordem de eficácia era diferente da obtida com as concentrações totais e, consequentemente, com a obtida no ensaio com a sonda fluoresceína na ausência dos lipossomas. Assim, o piroxicam era o composto para o qual se obtinha um menor valor de IC₉₀, no caso de apenas as concentrações aquosas dos compostos serem consideradas, e, pelo contrário, tendo em conta as concentrações totais, era o etodolac.

Os AINEs estudados também apresentaram, de uma forma dependente da concentração, efeito captador do radical $\text{ROO}^\bullet$, gerado pelo AAPH, quando essa actividade era avaliada pela desactivação de fluorescência da sonda HDAF. O composto mais eficaz, com um menor valor de IC_{50} , foi o etodolac.

A avaliação da actividade antioxidante face ao mesmo radical $\text{ROO}^\bullet$, gerado na fase aquosa, pela monitorização da degradação peroxidativa da sonda DPH-PA por estudos de fluorescência e de anisotropia de fluorescência, mostrou que, dos AINEs testados, apenas a clonixina e o indoprofeno não apresentaram actividade antioxidante. O etodolac foi o que apresentou um menor valor de IC_{50} . Contudo, quando o radical peroxilo era gerado pelo composto azo AMVN no interior da bicamada lipídica e a actividade antioxidante igualmente avaliada pela sonda DPH-PA, apenas o indoprofeno não apresentava actividade antioxidante e o composto mais eficaz era o tenoxicam. Os AINEs, assim como os antioxidantes de referência trolox e vitamina E, mostraram-se mais eficazes quando os radicais $\text{ROO}^\bullet$ eram gerados na fase aquosa do que quando gerados no interior da bicamada lipídica.

Todos os AINEs em estudo, com excepção do indoprofeno, foram capazes de inibir a peroxidação lipídica induzida pelo radical $\text{HO}^\bullet$, de um modo dependente da concentração. O etodolac foi o que se mostrou mais eficaz, apresentando um valor de IC_{15} inferior ao dos restantes AINEs. Neste estudo, ao contrário do estudo efectuado na presença da sonda DPH-PA e dos radicais $\text{ROO}^\bullet$ gerados na solução aquosa, os AINEs apresentaram um perfil de inibição da peroxidação lipídica semelhante ao obtido para o antioxidante de referência. De facto, os AINEs em estudo, assim como o trolox, parecem ser capazes de inibir a iniciação da peroxidação lipídica, visível pela formação de um patamar nas representações gráficas fluorescência relativa *versus* tempo. A elevada reactividade dos radicais $\text{HO}^\bullet$, comparativamente à dos radicais $\text{ROO}^\bullet$, deve ser a responsável pelos resultados obtidos, pois, após a sua formação, os radicais $\text{HO}^\bullet$ reagem rapidamente com as moléculas, como os AINEs, que estejam na sua proximidade. Adicionalmente, a menor eficiência dos radicais $\text{HO}^\bullet$ em iniciar a peroxidação lipídica, pela formação de espécies “não clássicas” da propagação da peroxidação lipídica, pode também ter contribuído para os resultados obtidos neste estudo.

Por último, a execução de determinados estudos em sistemas celulares, nomeadamente de fluidez membranar e de avaliação da actividade antioxidante pela sonda DPH-PA na peroxidação lipídica induzida pelo AAPH, como referido

anteriormente, permitiu a validação dos resultados obtidos com os lipossomas. Com efeito, mais uma vez se demonstra que os lipossomas constituem modelos valiosos das membranas biológicas, pois os resultados obtidos nos dois sistemas membranares são semelhantes.

Nos estudos de fluidez membrana, na presença de esplenócitos, o AINE que apresentou maior capacidade de fluidificação membrana foi o tenoxicam. Para o diclofenac, etodolac e indoprofeno não se observou qualquer alteração da microviscosidade das membranas. Por outro lado, nos estudos de avaliação da actividade antioxidante dos AINEs pela sonda DPH-PA na peroxidação lipídica induzida pelo AAPH o anti-inflamatório mais eficaz foi o etodolac, enquanto que a clonixina e o indoprofeno não apresentaram uma actividade antioxidante mensurável.

Com base no exposto, é possível concluir que o mecanismo de acção dos fármacos está intimamente dependente da sua estrutura química e da sua capacidade de interacção com sistemas biológicos, nomeadamente com as membranas celulares, que definem física e funcionalmente a unidade básica da vida, ou seja, a célula. Foi também possível observar que as interacções fármaco/membrana dependem simultaneamente das propriedades das próprias membranas, determinadas pela respectiva composição e carga, mas também das propriedades físico-químicas dos fármacos. De facto, a actividade biológica dos fármacos é muitas vezes condicionada pelas suas propriedades ácido-base, já que o grau de ionização das moléculas está intimamente ligado à lipossolubilidade que, por sua vez, se relaciona com o transporte através das membranas. Assim, o valor do pH do meio condiciona quer a carga da membrana, quer a carga do fármaco, e, conseqüentemente, a sua lipofilia, a qual por sua vez afecta a partição e também a localização dos diferentes compostos nas membranas biológicas.

Como perspectivas futuras para a continuação do trabalho iniciado nesta dissertação, seria interessante a determinação dos coeficientes de partição dos fármacos com lipossomas de composição mais semelhante à existente nas membranas celulares. Assim, utilizar-se-iam outros fosfolípidos, além da EPC, proteínas e enzimas membranares, no sentido de uma contínua aproximação dos sistemas biológicos reais. Adicionalmente, a incorporação na membrana de enzimas directa ou indirectamente envolvidas na génese dos processos inflamatórios, como as ciclooxigenases, lipoxigenases e fosfolipases, e a análise de como a interacção dos

fármacos com a membrana ou directamente com as enzimas influenciaria a actividade enzimática poderia contribuir para a constante elucidação do mecanismo de acção dos AINEs.

A continuação da avaliação da capacidade antioxidante dos anti-inflamatórios face a outras espécies reactivas de oxigénio, como o anião radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), e de azoto, como o anião peroxinitrito ($ONOO^-$) e o óxido nítrico ($^{\bullet}NO$), seria também importante para uma melhor compreensão do mecanismo de acção dos fármacos em estudo. Com efeito, as espécies reactivas referidas são capazes de oxidar biomoléculas importantíssimas dos sistemas biológicos vitais, como o ADN, as proteínas e os lípidos e, portanto, os fármacos que auxiliem os sistemas antioxidantes celulares a neutralizar tais espécies contribuem para a prevenção e cura de um grande número de doenças.

Uma outra perspectiva interessante seria avaliar a actividade anti-cancerígena dos AINEs numa linha celular tumoral. E, por fim, avaliar como determinadas acções biológicas dos AINEs, como por exemplo, a alteração da microviscosidade membranar e do potencial de membrana, contribuem para a sua actividade anti-inflamatória na presença de células estimuladas envolvidas no processo da inflamação, como os macrófagos.

