Catarina Isabel Guerra Rodrigues de Mansilha

ESTUDOS DE PARTIÇÃO E LOCALIZAÇÃO DE FÁRMACOS EM LIPOSSOMAS POR TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO

Dissertação submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto para obtenção do grau de Doutor em Química

Departamento de Química
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
2002

Catarina Isabel Guerra Rodrigues de Mansilha

ESTUDOS DE PARTIÇÃO E LOCALIZAÇÃO DE FÁRMACOS EM LIPOSSOMAS POR TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO

Dissertação submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto para obtenção do grau de Doutor em Química

Departamento de Química
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
2002

Índice Geral

Índice de Figuras ix

Índice de Tabelas xix

Abreviaturas xxiii

Prefácio xxv

Agradecimentos xxix

Resumo xxxi

PARTE PRIMEIRA: A TEORIA 3

Capítulo 1 LIPOSSOMAS COMO MODELOS BIOMEMBRANARES E VECTORES DE FÁRMACOS 5

1 Considerações físico-químicas 7

2 Preparação dos lipossomas 15

2.1 Selecção de sistemas lipossómicos 23

3 Estabilidade dos lipossomas 25

4 Métodos de caracterização dos lipossomas 28

5 Doseamento dos lípidos 32

6 Áreas de aplicação dos lipossomas 34

6.1 Lipossomas como modelos biomembranares 34

6.2 Lipossomas como vectores de fármacos 36

7 Composição fosfolipídica das vesículas lipossómicas utilizadas 38

Capítulo 2 ASPECTOS GERAIS SOBRE A ACÇÃO DE ALGUNS FÁRMACOS: IMPORTÂNCIA DA INTERACÇÃO COM LIPOSSOMAS 39

1 Agentes antituberculosos 41

2 Fluoroquinolonas 48

3 Agentes antifúngicos 56

4 Agentes ansiolíticos: benzodiazepinas 58

Capítulo 3 MÉTODOS EXPERIMENTAIS 65

1 Coeficientes de partição 65

1.1 Determinação de coeficientes de partição por espectrofotometria derivativa de UV-Vis 67

1.1.1 Modelos matemáticos para o cálculo dos coeficientes de partição 70

1.2 Determinação dos coeficientes de partição por espectrofluorimetria 72

1.2.1 Modelos matemáticos para o cálculo dos coeficientes de partição 76

1.3 Determinação dos coeficientes de partição após separação de fases 76

1.3.1 Filtração adjuvada pela centrifugação 79

1.3.2 Modelo matemático para o cálculo dos coeficientes de partição 81

2 Localização dos fármacos nos lipossomas 82

2.1 Aplicações da espectroscopia de fluorescência ao estudo da localização membranar dos fármacos 83

2.1.1 Sondas de fluorescência 84

2.1.2 Extinção de fluorescência 85

2.1.2.1 Extinção de fluorescência dinâmica ou colisional 86

2.1.2.2 Extinção de fluorescência estática 87

2.1.2.3 Desvios à equação de Stern-Volmer 88

2.1.2.4 Transferência de energia de ressonância (RET) 91

2.1.3 Extinção de fluorescência em estruturas organizadas 92

2.1.3.1 Agentes de extinção de fluorescência 93

2.1.3.2 Modelos matemáticos para a determinação da localização 97

2.1.4 Anisotropia de fluorescência 101

2.1.4.1 Sondas utilizadas nos ensaios de anisotropia de fluorescência 106

2.2 Ressonância Magnética Nuclear: aplicações da técnica de RMN ao estudo da localização membranar dos fármacos 109

PARTE SEGUNDA: A METODOLOGIA 113

Capítulo 4 METODOLOGIA EXPERIMENTAL 115

1 Reagentes e soluções 115

2 Instrumentação utilizada 116

3 Preparação de lipossomas 117

4 Granulometria dos lipossomas 118

5 Determinação do potêncial-zeta dos lipossomas 118

6 Verificação da estabilidade das preparações lipossómicas 119

7 Doseamento dos lípidos 119

8 Doseamento dos fármacos 119

9 Determinação das constantes de acidez dos fármacos 120

10 Coeficientes de partição 120

10.1 Determinação dos coeficientes de partição por espectrofotometria derivativa de UV-Vis 120

10.2 Determinação dos coeficientes de partição espectrofluorimetria 121

10.3 Determinação dos coeficientes de partição por separação de fases 122

11 Estudos de fluidez e localização 123

11.1 Extinção de fluorescência dos fármacos pelo ião iodeto 122

11.2 Extinção de fluorescência das sondas 2-AS e 12-AS pelos fármacos 124

11.3 Estudos de anisotropia de fluorescência 125

12 Estudos de ressonância magnética nuclear 125

PARTE TERCEIRA: OS RESULTADOS 127

Capítulo 5 DETERMINAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS LIPOSSOMAS E FÁRMACOS 129

1 Caracterização das vesículas lipossómicas 129

1.1 Granulometria dos lipossomas 129

1.2 Determinação do potencial-zeta dos lipossomas 130

1.3 Estabilidade das formulações lipossómicas 131

2 Propriedades de ácido/base dos fármacos 131

Capítulo 6 DETERMINAÇÃO DOS COEFICIENTES DE PARTIÇÃO DOS FÁRMACOS UTILIZADOS ENTRE UMA SOLUÇÃO AQUOSA E VESÍCULAS LIPOSSÓMICAS 137

1 Determinação dos coeficientes de partição recorrendo à espectrofotometria de UV-Vis 138

1.1 Determinação dos coeficientes de partição em LUVs de DMPC 142

1.2 Determinação dos coeficientes de partição em LUVs de DMPG 150

2 Determinação dos coeficientes de partição por espectroscopia de fluorescência 156

3 Determinação dos coeficientes de partição pelo método de separação de fases 161

4 Conclusões 165

Capítulo 7 LOCALIZAÇÃO DOS FÁRMACOS NAS VESÍCULAS LIPOSSÓMICAS DE DMPC e DMPG: ESTUDOS DE ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA E DE RMN 171

1 Estudos de localização efectuados por espectroscopia de fluorescência 171

1.1 Estudos de localização efectuados por extinção de fluorescência dos fármacos pelo ião iodeto 172

1.1.1 Estudos efectuados em LUVs de DMPC 172

1.1.2 Estudos efectuados em LUVs de DMPG 176

1.1.3 Conclusões 178

1.2 Estudos de localização efectuados por avaliação da interacção de fármacos com sondas membranares da série do ácido *n*-(9-antroiloxi)esteárico 179

1.2.1 Extinção de fluorescência das sondas *n*-AS pelo clordiazepóxido e pela isoniazida 180

1.2.1.1 Estudos efectuados em LUVs de DMPC 182

1.2.1.2 Estudos efectuados em LUVs de DMPG 183

1.2.1.3 Conclusões 184

1.2.2 Extinção de fluorescência das sondas *n*-AS pela rifampicina 186

1.2.2.1 Estudos efectuados em LUVs de DMPC 188

1.2.2.2 Estudos efectuados em LUVs de DMPG 189

1.2.2.3 Conclusões 192

1.3 Estudos de anisotropia de fluorescência 193

1.3.1 Estudos efectuados em LUVs de DMPC 195

1.3.2 Estudos efectuados em LUVs de DMPG 197

1.3.3 Conclusões 199

2 Estudos de localização efectuados por ^{1}H-RMN na presença do catião praseodímio (Pr^{3+}) 200

3 Conclusões finais 206

CONSIDERAÇÕES FINAIS 209

A BIBLIOGRAFIA 215

Bibliografia 217

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Representação da fórmula de estrutura dos fosfolípidos utilizados na preparação de lipossomas e dos principais grupos polares (R) encontrados nos fosfolípidos de origem natural. 8

Figura 1.2 Representação esquemática de algumas moléculas não fosfolipídicas utilizadas na preparação dos lipossomas. 10

Figura 1.3 Fases termodinâmicas das bicamadas fosfolipídicas (adaptado de Storm, 1987). 11

Figura 1.4 Classificação de lipossomas de acordo com o tamanho e número de lamelas. 13

Figura 1.5 Representação esquemática de uma molécula de fosfatidilcolina, mostrando as diversas regiões e orientação molecular na região de interface lípido / água. 14

Figura 1.6 Movimentos dos fosfolípidos na bicamada membranar: (a) movimento de rotação, (b) movimento de "flip-flop", (c) difusão lateral, (d) troca intervesicular. 15

Figura 1.7 Representação esquemática da formação de lipossomas multilamelares por hidratação do filme lipídico e dos lipossomas unilamelares pelos processos de extrusão e sonicação. 17

Figura 1.8 Representação esquemática da preparação de MLVs: 1) dissolução dos lípidos num solvente orgânico; 2) evaporação à secura do solvente e formação do filme lipídico nas paredes do balão. Ressuspensão do filme com uma solução aquosa; 3) agitação; 4) obtenção das vesículas multilamelares. 18

Figura 1.9 Micrografia electrónica de freeze-fracture de MLVs antes (A) e após (B) cinco ciclos de congelação-descongelação (Mayer, 1985). 19

Figura 1.10	Representação esquemática do processo de extrusão para a obtenção de LUVs.	21
Figura 1.11	Representação esquemática de uma vesícula unilamelar e das possíveis localizações dos fármacos (adaptado de Lasic, 1993).	24
Figura 1.12	Espectros de UV-Vis da fosfatidilcolina (—), da fosfatidilcolina moderadamente oxidada (---) e da fosfatidilcolina fortemente oxidada (·····) (daptado de New, R.R.C., 1990).	27
Figura 1.13	Representação esquemática do equipamento usado para a determinação do diâmetro dos lipossomas (Malvern Zeta Sizer 5000): A - Fonte de raios laser; B - Lente; C - Célula contendo a amostra; D - Fotomultiplicador.	30
Figura 1.14	Célula pertencente ao equipamento de espectroscopia de correlação fotónica, com representação esquemática do padrão das barras de interferência, dos dois eléctrodos e de uma partícula lipossómica da amostra carregada negativamente.	32
Figura 2.1	Fórmula de estrutura da isoniazida.	43
Figura 2.2	Representação do mecanismo de acção da isoniazida.	44
Figura 2.3	Fórmula de estrutura da rifampicina.	45
Figura 2.4	Representação do mecanismo de acção da rifampicina.	45
Figura 2.5	Relação entre a estrutura do ácido nalidíxico e da norfloxacina.	49
Figura 2.6	Fórmula de estrutura da grepafloxacina.	50
Figura 2.7	Representação do mecanismo de acção das fluoroquinolonas.	52
Figura 2.8	Mecanismos de resistência às fluoroquinolonas: 1-alterações na membrana externa das bactérias, nomeadamente ao nível das porinas; 2-expulsão activa dos fármacos; 3-mutações nas enzimas alvo.	54
Figura 2.9	Fórmula de estrutura da griseofulvina.	57

Figura 2.10	Representação do mecanismo de acção da griseofulvina.	57
Figura 2.11	Representação esquemática de uma sinapse.	60
Figura 2.12	Fórmula de estrutura do clordiazepóxido.	61
Figura 3.1	Fórmulas de estrutura das sondas *n*-AS.	96
Figura 3.2	Orientação das componentes da luz polarizada - excitação e emissão - numa experiência de anisotropia de fluorescência.	103
Figura 3.3	Orientação relativa (θ) dos vectores momento dipolar no estado fundamental (f) e no estado excitado (X) e redistribuição de orientações (despolarização) do vector momento dipolar (emissão) relativamente à direcção de excitação (observação) (φ).	103
Figura 3.4	Fórmulas de estrutura do DPH e do TMA-DPH.	107
Figura 4.1	Separação de fases usando tubos Centricon. **A** Representação dos tubos durante a separação de fases por ultra-filtração. Os lipossomas ficam retidos na membrana existente no reservatório onde é colocada a amostra, passando a fase aquosa para o reservatório de recolha dos filtrados. **B** Representação da posição dos reservatórios da amostra durante a centrifugação para recolha da fase lipídica.	122
Figura 5.1	Esquema do sistema automático de titulação. 1-Bureta automática; 2-Sistema de eléctrodos; 3-Agitador magnético; 4-Decimilivoltímetro; 5-Banho termostatizado; 6-Microprocessador.	132
Figura 5.2	Diagramas de distribuição para a grepafloxacina, norfloxacina e rifampicina. Relativamente às fluoroquinolonas, HLH representa a forma protonada, HL a forma de ião dipolar e HLH^{-1} a forma negativa ou de anião. Quanto à rifampicina, HLH representa a forma protonada, HL a forma neutra e HLH^{-1} a forma negativa.	135
Figura 6.1	Espectros de absorção (A) e espectros de segunda derivada (B) de suspensões vesiculares de DMPC em tampão Hepes, de concentrações (μM): (1) 136, (2) 227, (3) 287, (4) 425, (5) 514, (6) 584 e (7) 714.	139

Figura 6.2 Espectros de absorção (A) e espectros de segunda derivada (B) de suspensões vesiculares de DMPG em tampão Hepes, de concentrações (μM): (1) 130, (2) 295, (3) 455, (4) 524, (5) 634 e (6) 762. 140

Figura 6.3 Espectros de absorção do clordiazepóxido (concentração 14,0 μM) na presença de (A) concentrações crescentes de LUVs de DMPC (μM): (1) 0; (2) 128; (3) 248; (4) 516; (5) 770; (6) 895; (7) 1035; (8) 1313 e de (B) concentrações crescentes de LUVs de DMPG (μM): 144; 305; 464; 634; 658; 761; 912. 140

Figura 6.4 Espectros de subtracção do clordiazepóxido de ordem zero (A), de primeira derivada (B), de segunda derivada (C) e de terceira derivada (D). 141

Figura 6.5 Espectros de absorção do (**A**) clordiazepóxido (13,5 μM) e (**B**) rifampicina (22,3 μM), obtidos na ausência (1) e na presença de concentrações crescentes de DMPC (2-7 ou 2-8); concentrações de DMPC (μM): (A) 128; 248; 516; 770; 895; 1035; 1313. (B) 138; 266; 410; 542; 702; 849. Os espectros dos fármacos obtidos na ausência de lípido estão assinalados com os símbolos (++) de modo a facilitar a visualização dos pontos isosbésticos. 142

Figura 6.6 Espectros de absorção da (**A**) isoniazida (133,9 μM), (**B**) norfloxacina (12,9 μM) e (**C**) dibucaína (164,8 μM), obtidos na ausência (1;++) e na presença de concentrações crescentes de DMPC (2-7 ou 2-8); concentrações de DMPC (μM): (A) 172; 373; 444; 572; 680; 754. (B) 183; 229; 458; 572; 686; 915. (C) 134; 294; 447; 597; 726; 867. 143

Figura 6.7 Espectros de absorção da (**A**) griseofulvina (24,8 μM) e (**B**) grepafloxacina (23,0 μM), obtidos na ausência (1;++) e na presença de concentrações crescentes de DMPC (2-7 ou 2-8); concentrações de DMPC (μM): (A) 91; 138; 231; 470; 743; 880; 1020. (B) 176; 387; 580; 776; 978; 1122. 144

Figura 6.8 Segunda derivada dos espectros de absorção do clordiazepóxido (A) e da rifampicina (B) obtidos na ausência (1) e na presença de concentrações crescentes de DMPC (2-7). Ver concentrações na Figura 6.5. 146

Figura 6.9 Segunda derivada dos espectros de absorção da isoniazida (A), da norfloxacina (B) e da dibucaína (C) obtidos na ausência (1) e na presença de concentrações crescentes de DMPC (2-7). Ver concentrações na Figura 6.6. 147

Figura 6.10 Segunda derivada dos espectros de absorção da griseofulvina (A) e da grepafloxacina (B) obtidos na ausência (1) e na presença de concentrações crescentes de DMPC (2-7). Ver concentrações na Figura 6.7. 147

Figura 6.11 Ajuste das equações (3.6 e 3.7) aos dados experimentais obtidos. Método de regressão não linear (A) e método dos recíprocos duplos (B). Valores relativos à segunda derivada dos espectros do clordiazepóxido a 289 nm. 148

Figura 6.12 Espectros de absorção do (A) clordiazepóxido (15,6 μM) e da (B) Rifampicina (30,0 μM) obtidos na ausência (1;++) e na presença de concentrações crescentes de DMPG (2-8 e 2-7); DMPG (μM): (A) 143; 305; 464; 634; 658; 761; 912. (B) 95; 200; 299; 405; 572; 707. 150

Figura 6.13 Espectros de absorção da (A) isoniazida (177,7 μM), da (B) norfloxacina (23,3 μM) e da (C) dibucaína (160,0 μM), obtidos na ausência (1;++) e na presença de concentrações crescentes de DMPG (2-7 ou 2-8); concentrações de DMPG (μM): (A) 115; 242; 295; 370; 495; 611; 755. (B) 168; 331; 492; 677; 823; 1003. (C) 158; 317; 489; 656; 700; 861; 912. 151

Figura 6.14 Espectros de absorção da (A) griseofulvina (13,9 μM) e da (B) grepafloxacina (22,9 μM), obtidos na ausência (1;++) e na presença de concentrações crescentes de DMPG (2-7 ou 2-8); concentrações de DMPG (μM): (A) 99; 199; 249; 312; 405; 609; 811. (B) 155; 304; 464; 622; 764; 926. 152

Figura 6.15 Segunda derivada dos espectros de absorção do clordiazepóxido (A) e da rifampicina (B) obtidos na ausência (1) e na presença de concentrações crescentes de DMPG (2-7). Ver concentrações na Figura 6.12. 153

Figura 6.16 Segunda derivada dos espectros de absorção da isoniazida (A), da norfloxacina (B) e da dibucaína (C) obtidos na ausência (1) e na presença de concentrações crescentes de DMPG (2-7 ou 2-8). Ver concentrações na Figura 6.13. 153

Figura 6.17 Segunda derivada dos espectros de absorção da griseofulvina (A) e da grepafloxacina (B) obtidos na ausência (1) e na presença de concentrações crescentes de DMPC (2-7 ou 2-8). Ver concentrações na Figura 6.14. 154

Figura 6.18 Ajuste das equações (3.6 e 3.7) aos dados experimentais obtidos. Método de regressão não linear (A) e método dos recíprocos duplos (B). Valores relativos à segunda derivada dos espectros da grepafloxacina a 273 nm. 155

Figura 6.19 Espectros de emissão de suspensões em tampão Hepes contendo concentrações crescentes de vesículas unilamelares de DMPC (200μM a 1000μM), após excitação a 320 nm. 157

Figura 6.20 Espectros de emissão de fluorescência da grepafloxacina (10 μM) na ausência (1) e na presença (2-7) de concentrações crescentes de (A) DMPC e (B) DMPG. Concentrações de DMPC (μM): 185; 259; 461; 527; 645; 803. Concentrações de DMPG (μM): 193; 289; 401; 507; 613; 793. Comprimento de onda de excitação 330 nm. 158

Figura 6.21 Espectros de emissão de fluorescência da norfloxacina (9,5 μM) na ausência (1) e na presença (2-7) de concentrações crescentes de (A) DMPC e (B) DMPG. Concentrações de DMPC (μM): 125; 239; 451; 523; 671; 743. Concentrações de DMPG (μM): 102; 213;325; 439; 547; 658. Comprimento de onda de excitação 320 nm. 158

Figura 6.22 Espectros de emissão de fluorescência da griseofulvina (10 μM) na ausência (1) e na presença (2-7 e 2-10) de concentrações crescentes de (A) DMPC e (B) DMPG. Concentrações de DMPC (μM): 105; 221; 398; 537; 682; 769. Concentrações de DMPG (μM): 99; 199; 248; 312; 405; 499; 593; 686; 811. Comprimento de onda de excitação 295 nm. 159

Figura 6.23 Ajuste das equações (3.11 e 3.12) aos dados experimentais obtidos. Método de regressão não linear (A) e método dos recíprocos duplos (B). Valores relativos à segunda derivada dos espectros da grepafloxacina em DMPG a 440 nm. 160

Figura 6.24 Espectros de absorção referentes às suspensões iniciais (1), aos filtrados (2) e às suspensões obtidas após ressuspensão dos sedimentos (3) resultantes da ultra-filtração de suspensões de LUVs de DMPC (1000 μM) contendo (A) clordiazepóxido (13,9 μM) e (B) rifampicina (22,3 μM), após diluição com etanol na proporção tampão Hepes:etanol de 1:10. 162

Figura 6.25 Espectros de absorção referentes às suspensões iniciais (1), aos filtrados (2) e às suspensões obtidas após ressuspensão dos sedimentos (3) resultantes da ultra-filtração de suspensões de LUVs de DMPC (1000 μM) contendo (A) isoniazida (97,2 μM), (B) norfloxacina (12,5 μM) e (C) dibucaína (170,0 μM), após diluição com etanol na proporção tampão Hepes:etanol de 1:10. 163

Figura 6.26 Espectros de absorção referentes às suspensões iniciais (1), aos filtrados (2) e às suspensões obtidas após ressuspensão dos sedimentos (3) resultantes da ultra-filtração de suspensões de LUVs de DMPC (1000 μM) contendo (A) griseofulvina (17,8 μM) e (B) grepafloxacina (12,5 μM), após diluição com etanol na proporção tampão Hepes:etanol de 1:10. 163

Figura 7.1 Variação da intensidade de fluorescência da (A) griseofulvina (10 μM) e da (B) grepafloxacina (10 μM) em presença de concentrações crescentes de KI, em tampão Hepes (□)e em suspensões de DMPC: 250 μM (●), 500 μM (▲) e 700 μM (♦). 173

Figura 7.2 Representação gráfica da equação de Stern-Volmer para a extinção de fluorescência da (A) griseofulvina e da (B) grepafloxacina pelo ião iodeto, em tampão Hepes (□) e em suspensões de DMPC: 250 μM (●), 500 μM (▲) e 700 μM (♦). 174

Figura 7.3 Espectros de absorção (A) e de excitação de fluorescência (B) da griseofulvina na presença de concentrações crescentes de ião iodeto (1-4): 0,0 M, 0,02 M, 0,1 M e 0,2 M. 174

Figura 7.4 Variação da intensidade de fluorescência da (A) griseofulvina (10 μM) e da (B) grepafloxacina (10 μM) em presença de concentrações crescentes de KI, em tampão Hepes (□) e em suspensões de DMPG: 250 μM(●), 500 μM (▲) e 700 μM (♦). 176

Figura 7.5 Representação gráfica da equação de Stern-Volmer para a extinção de fluorescência da (A) griseofulvina e da (B) grepafloxacina pelo ião iodeto, em tampão Hepes (□) e em suspensões de DMPG: 250 μM(●), 500 μM (▲) e 700 μM (♦). 177

Figura 7.6 Representação esquemática da incorporação das sondas 2-AS e 12-AS nas membranas fosfolipídicas. 180

Figura 7.7 Representação gráfica da equação de Stern-Volmer para a extinção de fluorescência das sondas 2-AS (●) e 12-AS (□) em LUVs de DMPC (500 μM) pelo clordiazepóxido (A) e pela isoniazida (B). 182

Figura 7.8 Representação gráfica da equação de Stern-Volmer para a extinção de fluorescência das sondas 2-AS (●) e 12-AS (□) em LUVs de DMPG (500 μM) pelo clordiazepóxido (A) e pela isoniazida (B). 183

Figura 7.9 Representação esquemática da possível localização do clordiazepóxido e da isoniazida nas membranas fosfolipídicas de DMPC. 185

Figura 7.10 Espectros de emissão das sondas 2-AS e 12-AS (λ_{ex} 365 nm; escala da direita) e espectro de absorção (escala da esquerda) da rifampicina em LUVs de DMPC (zona sombreada) e DMPG. 187

Figura 7.11 Eficiências teóricas (□) e experimentais (●) de transferência de energia entre as sondas 2-AS e 12-AS e a rifampicina em função de n /Å² (densidade superficial de aceitantes). 189

Figura 7.12 Eficiências teóricas (□) e experimentais (●) de transferência de energia entre as sondas 2-AS e 12-AS e a rifampicina em função de n /Å² (densidade superficial de aceitantes). 190

Figura 7.13 Representação da variação da intensidade de luz dispersa em função da concentração das sondas 2-AS e 12-AS em tampão Hepes. 191

Figura 7.14 Eficiências teóricas (□) e experimentais (●) de transferência de energia entre as sondas 2-AS e 12-AS e a rifampicina em função de n /Å² (densidade superficial de aceitantes) obtidas pelo método do filme conjunto. 192

Figura 7.15 Representação esquemática da incorporação das sondas DPH e TMA-DPH em membranas fosfolipídicas 194

Figura 7.16 Variação, com a temperatura, da anisotropia de fluorescência (*r*) da sonda TMA-DPH na ausência (□) e na presença (●) da isoniazida (A) e variação da anisotropia de fluorescência da sonda DPH na ausência (□) e na presença (●) da griseofulvina (B). 195

Figura 7.17 Variação, com a temperatura, da anisotropia de fluorescência (*r*) da sonda TMA-DPH (A) e da sonda DPH (B) na ausência (□) e na presença (●) do clordiazepóxido. 196

Figura 7.18 Variação, com a temperatura, da anisotropia de fluorescência (*r*) da sonda TMA-DPH na ausência (□) e na presença (●) do clordiazepóxido (A) e variação da anisotropia de fluorescência da sonda DPH na ausência (□) e na presença (●) da rifampicina (B). 197

Figura 7.19 Variação, com a temperatura, da anisotropia de fluorescência (*r*) da sonda TMA-DPH (A) e da sonda DPH (B) na ausência (□) e na presença (●) da grepafloxacina. 198

Figura 7.20 Variação, com a temperatura, da anisotropia de fluorescência (*r*) da sonda TMA-DPH (A) e da sonda DPH (B) na ausência (□) e na presença (●) da griseofulvina. 198

Figura 7.21 Espectro de ^{1}H-RMN de uma suspensão lipossómica de DMPG. 201

Figura 7.22 Espectros de ^{1}H-RMN de (a) suspensão lipossómica de DMPC (14 mM) e (b) suspensão lipossómica de DMPC e Pr^{3+} (10 mM), onde é possível observar o desdobramento do sinal correspondente aos protões dos grupos trimetilamónio das moléculas localizadas na superfície externa (E) e interna (I) da bicamada membranar. 202

Figura 7.23 Valores dos desvios químicos dos sinais externo (E) e interno (I) dos grupos N-metil colina das moléculas fosfolipídicas de DMPC em função da concentração de praseodímio. 202

Figura 7.24 Diferenças referentes aos deslocamentos químicos dos picos interno e externo (Δppm) do grupo colina em função da concentração de Pr^{3+}. 203

Figura 7.25 Espectros de ^{1}H-RMN de DMPC (14 mM), Pr^{3+} (10mM) e rifampicina (a) 16 μM, (b) 60 μM, (c) 120 μM e (d) 210 μM. 204

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 Principais áreas científicas de aplicação dos lipossomas (adaptado de Lasic, D.D., 1993) 34

Tabela 1.2 Algumas formulações lipossómicas (adaptado de (Sharma, A. e Sharma, U.S., 1997), (Cruz, M.E.M., 1999), (Barbosa, C.M.G., 1995)). 37

Tabela 5.1 Diâmetros e respectivos índices de polidispersão das vesículas unilamelares de DMPC e DMPG na ausência e na presença dos fármacos. 129

Tabela 5.2 Potenciais-zeta[a] das vesículas lipossómicas unilamelares de DMPC e DMPG, na ausência e na presença dos fármacos. 130

Tabela 5.3 Estabilidade em tampão Hepes, à temperatura de 4 °C, de vesículas lipossómicas multilamelares (MLV) e unilamelares (LUV) de DMPC e DMPG: dimensão das vesículas (nm) e homogeneidade das suspensões. 131

Tabela 5.4 Constantes de acidez dos fármacos. 134

Tabela 6.1 Valores dos comprimentos de onda máximos, $\lambda_{máx}$ (nm), dos espectros de absorção e dos comprimentos de onda máximos, $\lambda_{máx}$ (nm), e mínimos, λ_{min} (nm), dos espectros de segunda derivada dos fármacos. 149

Tabela 6.2 Coeficientes de partição do clordiazepóxido, rifampicina, isoniazida, norfloxacina, dibucaina, griseofulvina e grepafloxacina em DMPC. 150

Tabela 6.3 Valores dos comprimentos de onda máximos, $\lambda_{máx}$ (nm), dos espectros de absorção e dos comprimentos de onda máximos, $\lambda_{máx}$ (nm) e mínimos, λ_{min} (nm), dos espectros de segunda derivada dos fármacos. 155

Tabela 6.4 Coeficientes de partição do clordiazepóxido, rifampicina, isoniazida, norfloxacina, dibucaína, griseofulvina e grepafloxacina em DMPG. 156

Tabela 6.5 Coeficientes de partição da grepafloxacina, norfloxacina e griseofulvina em DMPC e DMPG. 161

Tabela 6.6 Valores dos coeficientes de partição dos fármacos em lipossomas unilamelares de DMPC calculados após separação de fases por ultra-filtração. 164

Tabela 6.7 Valores da E.E. dos fármacos em lipossomas unilamelares de DMPC. 165

Tabela 6.8 Coeficientes de partição (K_p) dos fármacos em água (Hepes)/DMPC, água (Hepes)/DMPG e em sistemas água/*n*-octanol ($K_{a/o}$), bem como a solubilidade em água (S) a 25 °C. 167

Tabela 7.1 Valores das constantes de Stern-Volmer (K_D) e respectivos coeficientes de correlação linear (r) para a griseofulvina e grepafloxacina. 175

Tabela 7.2 Valores das constantes de Stern-Volmer (K_D) e respectivos coeficientes de correlação linear (r) para a griseofulvina e grepafloxacina. 177

Tabela 7.3 Valores das constantes de Stern-Volmer (K_D) e respectivos coeficientes de correlação linear (r) para o clordiazepóxido em lipossomas de DMPC. 183

Tabela 7.4 Valores das constantes de Stern-Volmer (K_D) e respectivos coeficientes de correlação linear (r) para o clordiazepóxido em lipossomas de DMPG. 184

Tabela 7.5 Valores dos raios de Förster (R_0) e das eficiências de transferência de energia (E), para uma concentração total de 15 μM de rifampicina em 500 μM de DMPC. 188

Tabela 7.6 Valores dos raios de Förster (R_0) e das eficiências de transferência de energia (E), para uma concentração total de 15 μM de rifampicina em 500 μM de DMPG. 192

Tabela 7.7 Temperatura de transição de fase (T_m) do DMPC na ausência e na presença dos fármacos. 196

Tabela 7.8 Temperatura de transição de fase (T_m) do DMPG na ausência e na presença dos fármacos. 199

Tabela 7.9 Desvios químicos dos sinais referentes às vesículas de DMPC em função da concentração de Pr^{3+}. 203

Tabela 7.10 Concentrações dos fármacos necessárias para a união dos sinais referentes ao grupo colina das moléculas fosfolipídicas. 205

Tabela 7.11 Análise das regressões lineares de Δppm referentes aos sinais externo e interno do grupo colina em função da concentração dos fármacos. Os ensaios foram realizados para um número de amostras igual ou superior a 5. 205

ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
CIM	concentração inibitória mínima
CMC	concentração micelar crítica
DMPC	dimiristoilfosfatidilcolina
DMPG	dimiristoilfosfatidilglicerol
DPH	1,6-fenil-1,3,5-hexatrieno
EE	eficácia de encapsulação
ε	absortividade molar
GABA	ácido γ-aminobutírico
$K_{a/o}$	coeficiente de partição água/*n*-octanol
K_p	coeficiente de partição
LUV	vesículas unilamelares grandes
LUVET	vesículas unilamelares grandes obtidas por extrusão
λ	comprimento de onda
MLV	vesículas multilamelares
***n*-AS**	ácido *n*-antroiloxiesteárico
r	anisotropia de fluorescência
RET	transferência de energia de ressonância
RMN	ressonância magnética nuclear
RPE	ressonância paramagnética electrónica

SUV	vesículas unilamelares pequenas
T_m	temperatura de transição de fase
TMA-DPH	1-(4-trimetilamóniofenil)-6-fenil-1,3,5-hexatrieno
UV-Vis	ultravioleta-visível

PREFÁCIO

As grandes transformações verificadas na área da saúde têm estado intimamente associadas à evolução científica e tecnológica dos medicamentos.

Até à década de 60, o grande objectivo de quem preparava medicamentos era o de garantir que o produto final contivesse uma quantidade exacta de substância activa, considerada necessária e suficiente para exercer os efeitos terapêuticos pretendidos, bem como assegurar a estabilidade física, química e biológica do medicamento até à sua utilização. Posteriormente, com o prodigioso desenvolvimento do arsenal terapêutico, o medicamento deixou de constituir uma simples forma de administração de uma dada substância farmacologicamente activa, para se tornar, essencialmente, num sistema de cedência da substância activa, com capacidade para a colocar à disposição do organismo a uma velocidade conveniente e numa quantidade susceptível de desencadear a resposta terapêutica. Surgiu assim o conceito de biodisponibilidade, hoje em dia plenamente assumido e integrado.

Temos vindo a assistir também ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que proporcionam uma combinação óptima das características farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos agentes bioactivos, com vista a maximizar o seu potencial terapêutico e a minimizar a sua toxicidade, bem como ao desenvolvimento de técnicas capazes de permitir um estudo aprofundado do mecanismo de acção dos fármacos. Esteúltimo aspecto está intimamente dependente da sua estrutura química e da capacidade de interagir com sistemas biológicos, nomeadamente com as membranas celulares e, neste contexto, a utilização dos lipossomas tem adquirido extrema importância como modelos de membranas celulares.

Os lipossomas são vesículas esféricas prefeitamente manipuláveis e caracterizáveis, sobre um ponto de vista fisico-químico, constituídas basicamente por fosfolípidos naturais ou sintéticos, cuja estrutura se assemelha às membranas celulares.

A investigação realizada na área dos lipossomas tem vindo a expandir-se de uma forma notável, sendo estas vesículas amplamente utilizadas como veículos de fármacos e como modelos membranares em estudos bioquímicos e biofísicos, solucionando muitos dos problemas inerentes aos ensaios *in vivo*.

Os maiores êxitos da sua utilização clínica têm consistido, sobretudo, no incremento do índice terapêutico dos fármacos, cuja utilidade estava limitada por diversos factores, bem como no conhecimento e interpretação do complexo processo de interacção dos fármacos com as membranas biológicas, aspecto fundamental para a compreensão do seu mecanismo de acção terapêutica.

Do exposto se depreende a importância do estudo da interacção, a nível molecular, dos fármacos com os lipossomas, objectivo da contribuição desta dissertação, que pode ser caracterizada quantitativamente pela determinação dos coeficientes de partição e qualitativamente pela elucidação da natureza da referida interacção e da localização dos fármacos nas membranas lipídicas. Para tal foram utilizadas diversas ténicas espectroscópicas tais como a espectrofotometria de ultravioleta-visível, a espectroscopia de fluorescência e a ressonância magnética nuclear, tendo sido mantidas, em todos os casos, as condições fisiológicas de temperatura e pH.

Descreve-se, em seguida, a organização desta dissertação que engloba três partes distintas; **A Teoria**, em que se começa por fazer um enquadramento da importância das interacções, a nível molecular, dos fármacos em estudo com as vesículas lipossómicas e em que são definidos os conceitos básicos para a compreensão do trabalho experimental realizado. Esta parte é constituída por três capítulos dedicados à descrição de alguns aspectos fundamentais das vesículas lipossómicas, nomeadamente das suas propriedades físicas e

estruturais (capítulo 1), de aspectos gerais sobre a acção dos fármacos e importância da sua interacção com lipossomas (capítulo 2) e, finalmente, por um capítulo referente aos métodos experimentais utilizados, nomeadamente aos métodos destinados ao cálculo dos coeficientes de partição dos fármacos entre uma fase aquosa e as vesículas lipossómicas e aos métodos de análise da localização membranar dos fármacos (capítulo 3).

A segunda parte, **A Metodologia**, engloba um único capítulo (capítulo 4) onde são descritos os reagentes e soluções utilizadas, a instrumentação, a preparação e caracterização dos lipossomas, a preparação das soluções dos fármacos e as várias metodologias para a determinação dos coeficientes de partição e localização a nível das membranas fosfolipídicas.

A terceira parte, **Os Resultados**, está dividida em três capítulos onde se apresentam os resultados obtidos relativamente à caracterização físico-química dos lipossomas e fármacos (capítulo 5), os coeficientes de partição calculados por diversas técnicas (capítulo 6) e os estudos referentes à localização dos fármacos nas vesículas, efectuados por espectroscopia de fluorescência e por ressonância magnética nuclear (capítulo 7).

Finalmente, são apresentadas as considerações finais acerca dos resultados experimentais obtidos e da sua importância relativamente à interacção dos fármacos com as vesículas lipossómicas.

AGRADECIMENTOS

Ao concluir este trabalho agradeço a todos quantos permitiram que ele se tornasse possível:

Ao Professor Doutor Baltazar de Castro agradeço a dedicação com que cumpriu a sua missão de orientador científico, a oportunidade de realizar este trabalho de investigação e a amizade e confiança que sempre me demonstrou.

À Professora Doutora Paula Gameiro agradeço pela orientação e supervisão de todos os passos deste trabalho, pelo apoio, disponibilidade, amizade e pela sua contribuição para a minha formação científica.

Ao Professor Doutor José Luís Costa Lima manifesto o meu agradecimento pelo apoio e interesse demonstrados durante a realização do meu trabalho.

Agradeço à Professora Doutora Maria de La Salette pela disponibilidade e amizade que me dispensou, bem como à Carla Matos, à Carla Guimarães e a todos os membros do Departamento de Química-Física da Faculdade de Farmácia do Porto.

Ao Professor Doutor Manuel Prieto agradeço, reconhecida, a simpatia, a confiança e a disponibilidade que sempre me dispensou, bem como os seus esclarecimentos tão úteis e valiosos.

Às Professoras Doutoras Eulália, Conceição, Clara e Cristina pela boa vontade e atenção demonstradas ao longo destes anos.

A todos os meus amigos e colegas do Departamento de Química Inorgânica, que directa ou indirectamente contribuíram para a eleboração deste trabalho, com especial agradecimento à Carla, ao Francisco, à Ana Rosa, à Paula, à Rita, ao Luís e também à Maria José pelo seu apoio ao longo destes anos e pelo inegável carinho sempre demonstrado.

À Faculdade de Química por me ter aceite como aluna de Doutoramento.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia pela concessão da Bolsa de Doutoramento.

À minha família agradeço o apoio e a ajuda nunca negados.

Ao Nuno, a presença e o incentivo constantes.

Aos Meus Pais, a educação e as oportunidades que me proporcionaram.

Aos Meus Tios, a amizade e o apoio incondicional ao longo destes últimos anos da minha vida.

Resumo

O objectivo do trabalho descrito nesta dissertação centrou-se no estudo da interacção de vários fármacos com vesículas lipossómicas unilamelares de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) e dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG), a pH 7,4 e à temperatura de 37 °C.

As vesículas lipossómicas utilizadas foram preparadas pela técnica de extrusão e caracterizadas morfologicamente por espectroscopia de correlação fotónica. Quanto à interacção com os fármacos, a extensão do equilíbrio de partição foi quantificada pelos coeficientes de partição lipossomas/solução aquosa (tampão Hepes), recorrendo a três metodologias diferentes e que permitiram a obtenção de resultados precisos e exactos. Uma das metodologias envolveu a separação de fases recorrendo a uma técnica de ultrafiltração das suspensões lipídicas contendo os fármacos, cuja quantificação, nas fases lipídica e aquosa, permitiu a determinação dos valores dos coeficientes de partição e das eficácias de encapsulação.

As restantes metodologias não envolveram separação de fases e recorreram não só à espectrofotometria derivativa de UV-Vis, que possibilitou a determinação dos coeficientes de partição dos fármacos devido à eliminação eficaz das interferências espectrais causadas pela presença de estruturas organizadas como, também, à espectroscopia de fluorescência que, permitiu igualmente a eliminação das referidas interferências.

Este estudo foi estendido à determinação da localização dos fármacos nos lipossomas e, nesta perspectiva, utilizaram-se técnicas de fluorescência e de ressonância magnética nuclear. Relativamente às primeiras, efectuaram-se ensaios de extinção de fluorescência recorrendo a sondas de fluorescência de localização conhecida (sondas da série *n*-AS), ou utilizando o ião iodeto como agente de extinção quando os fármacos eram fluorescentes. Efectuaram-se

igualmente ensaios de anisotropia de fluorescência, com as sondas DPH e TMA-DPH, de modo a determinar não só a localização membranar dos fármacos, como também proceder à detecção de alterações na estrutura membranar, nomeadamente alterações da fluidez.

Finalmente, a técnica de ressonância magnética nuclear de protão e em que se utilizou catiões de lantanídeos como agentes de deslocamento, permitiu inferir acerca da localização membranar de alguns dos fármacos estudados, através da detecção de alterações espectrais dos sinais correspondentes aos protões dos grupos trimetilamónio das moléculas de DMPC, localizados na superfície externa e interna da bicamada membranar das vesículas fosfolipídicas.

ESTUDOS DE PARTIÇÃO E LOCALIZAÇÃO DE FÁRMACOS EM LIPOSSOMAS POR TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS

PARTE PRIMEIRA

A teoria

Capítulo 1 LIPOSSOMAS COMO MODELOS BIOMEMBRANARES E VECTORES DE FÁRMACOS

Os lipossomas são vesículas esféricas, com diâmetros compreendidos entre alguns nanómetros e alguns micrómetros, constituídos basicamente por fosfolípidos naturais ou sintéticos, podendo também incluir outros componentes membranares, tais como o colesterol, que lhes conferem maior estabilidade¶ (New, R.R.C., 1990). Foi Alec Bangham quem, em 1965, descreveu pela primeira vez a formação espontânea de estruturas membranares fechadas, após a dispersão de fosfolípidos num meio aquoso (Bangham, A.D.*et al.*, 1965). O termo lipossoma surgiu mais tarde e deve-se a Weissman, que reuniu numa só palavra dois elementos de origem grega: *lipo* (significando gordura) e *soma* (significando corpo) (Sessa, G. e Weissmann, G., 1968).

A investigação realizada na área dos lipossomas tem vindo a expandir-se de uma forma notável desde os trabalhos pioneiros de Bangham, tendo-se centrado inicialmente na sua utilização como modelos membranares em estudos bioquímicos e biofísicos, nos quais ainda hoje ocupam lugar de grande relevo. Após os estudos de Gregoriadis nos anos 70 (Gregoriadis, G., 1976), os lipossomas alcançaram uma importância notável como candidatos a veículos de fármacos, constituindo actualmente verdadeiros sucessos da terapêutica moderna (Irma, A.J.M. *et al.*, 1998).

A estrutura dos lipossomas caracteriza-se pela existência de bicamadas lipídicas, formando vesículas mono ou plurimembranares que encerram compartimentos aquosos. Dada a sua capacidade de mimetização de membranas celulares, os lipossomas adquiriram uma importância enorme como modelos biomembranares pois, a possibilidade de controlo

¶ O conceito de estabilidade de lipossomas é abordado na página 25.

dos papeis assumidos por cada um dos componentes das membranas em processos específicos, permitiu o conhecimento de mecanismos fundamentais para os fenómenos biológicos, tais como a absorção, transporte de moléculas exógenas, reconhecimento celular, funcionamento de enzimas e modo de acção dos fármacos (Pramauro, E. e Pelizzetti, E., 1996).

Os lipossomas são altamente biocompatíveis, biodegradáveis e praticamente desprovidos de toxicidade e as suas características farmacocinéticas, nomeadamente a sua biodistribuição, podem ser moduladas através de uma correcta selecção de diversos parâmetros operacionais. Estas propriedades, juntamente com a capacidade de transportarem grande diversidade de substâncias, quer encapsuladas na fase aquosa, quer incorporadas na bicamada lipídica, contribuíram decisivamente para que os lipossomas passassem a ser considerados sistemas altamente promissores no domínio da vectorização de agentes bioactivos (Pinto-Alphandary, H. *et al.*, 2000).

Como propriedades fundamentais dos lipossomas pode-se destacar: (a) o fornecimento simultâneo, num mesmo sistema, 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 (conceito de micro-reservatórios) ou para as células (através de fusão ou endocitose), bem como de direccionamento para o local de acção através de marcações específicas; e (d) a possibilidade de administração *in vivo* por via intravenosa, ocular, pulmonar, nasal, oral, intramuscular, subcutânea e dérmica (Sharma, A. e Sharma, U.S., 1997).

Resumindo, 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 Considerações físico-químicas

Os fosfolípidos são moléculas anfipáticas, derivadas do glicerol ou da esfingosina (Lehninger, A.L., 2000). Os primeiros, denominam-se fosfoglicerídeos e consistem numa parte central, constituída por glicerol, a qual está conjugada com uma parte hidrófila e uma parte hidrófoba. Esta última é formada por uma ou duas cadeias hidrocarbonadas de ácidos gordos saturados ou insaturados, que esterificam igual número de grupos hidroxilo do glicerol, apresentando cada uma entre 12 a 24 átomos de carbono. A parte hidrófila dos fosfoglicerídeos encontra-se esterificada no terceiro hidroxilo do glicerol e é composta por uma molécula de ácido fosfórico (no caso do ácido fosfatídico) ou por um conjunto formado por ácido fosfórico e por uma molécula hidrossolúvel, esterificados entre si. A molécula hidrossolúvel contém, pelo menos, um grupo hidroxilo, sendo as mais comuns a colina, o glicerol, o inositol, a serina ou a etanolamina (ver Figura 1.1). Assim, conforme os respectivos radicais, os fosfoglicerídeos podem ser electricamente neutros ou apresentar carga negativa (New, R.R.C., 1990), (Lasic, D.D., 1993).

Os ácidos gordos saturados são muito flexíveis, possuindo cada ligação simples a possibilidade de rotação, ao contrário dos insaturados que são moléculas mais rígidas. A ligação dupla *cis*, muito mais comum, provoca uma conformação em que os dois fragmentos ligadas ao grupo alcénico formam entre si um ângulo de cerca de 30°, o que dificulta o empacotamento destas moléculas na bicamada (New, R.R.C., 1990).

Muitas das propriedades físicas dos lipossomas, tais como a sua estabilidade, permeabilidade ou temperatura de transição de fase, dependem do comprimento e grau de saturação dos fosfolípidos que os constituem. Os fosfolípidos naturais geralmente possuem duas cadeias, uma mais longa e/ou mais insaturada ligada à posição 2 do esqueleto do glicerol, enquanto que a outra está ligada à posição 1 (Lasic, D.D., 1993).

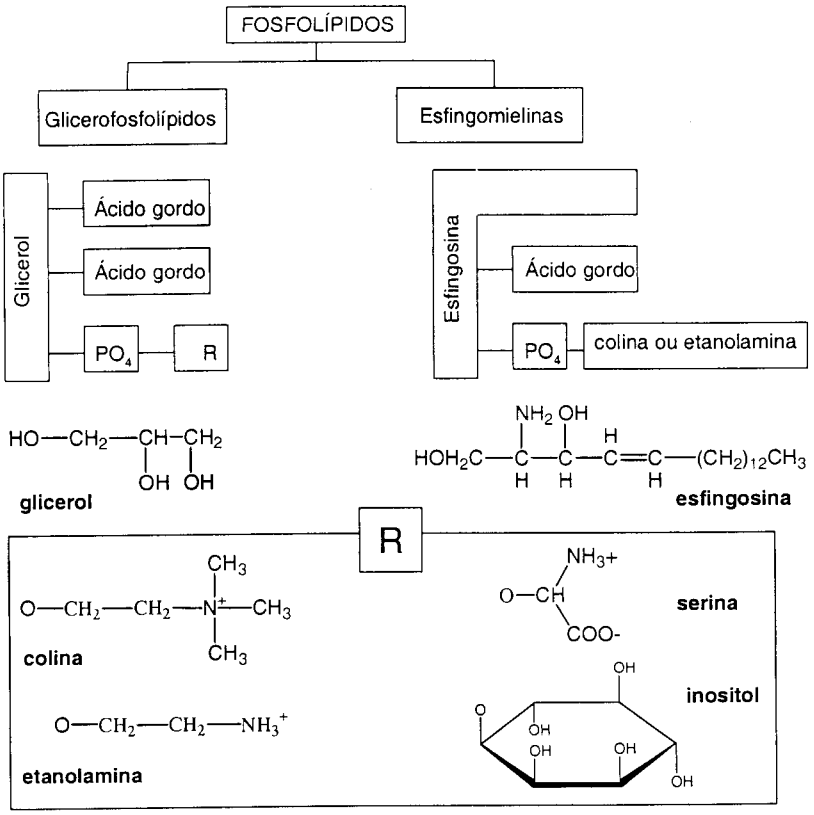


Figura 1.1 Representação esquemática dos fosfolípidos utilizados na preparação de lipossomas e fórmulas de estrutura dos principais grupos polares (R) encontrados nos fosfolípidos de origem natural.

Os fosfolípidos contendo colina são os mais abundantes na natureza. São iões dipolares a pH fisiológico, com o grupo amónio quaternário apresentando carga positiva e o grupo fosfato carga negativa (New, R.R.C., 1990). Com excepção da fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, os restantes fosfolípidos apresentam carga negativa, razão pela qual as membranas biológicas exibem uma carga superficial negativa, importante para muitos processos fisiológicos.

As esfingomielinas são também consideradas fosfolípidos uma vez que contêm fósforo sendo, contudo, os únicos fosfolípidos das biomembranas que não derivam do glicerol (Lehninger, A.L., 2000). Em seu lugar apresentam uma molécula de esfingosina a qual, quimicamente, é um álcool aminado contendo uma cadeia hidrocarbonada longa e insaturada. Por esta razão, são também classificadas como esfingolípidos. Nas

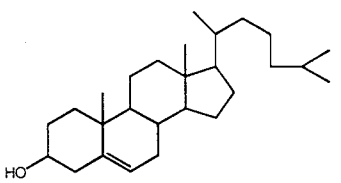
esfingomielinas o grupo amina da esfingosina encontra-se ligado a uma ácido gordo, através de uma ligação amida, enquanto que o grupo hidroxilo primário está esterificado na fosforilcolina ou na fosforiletanolamina. Assim, a conformação das esfingomielinas assemelha-se à da fosfatidilcolina.

Os fosfolípidos de origem natural são extraídos de materiais biológicos. Por exemplo, as fosfatidilcolinas (também designadas lecitinas) obtêm-se da soja ou da gema de ovo e a fosfatidilserina obtém-se do cérebro bovino. Estes produtos naturais são geralmente heterogéneos no que respeita às cadeias hidrocarbonadas dos ácidos gordos esterificados e exibem um grau variável de insaturação. Os ácidos gordos saturados mais frequentes nas membranas naturais são o mirístico, o palmítico e o esteárico, enquanto que dos insaturados o mais importante é o ácido oleico, com 18 carbonos e uma ligação dupla.

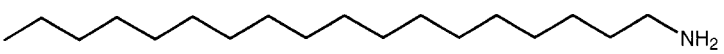
Os fosfolípidos também podem ser obtidos por síntese, como por exemplo a dipalmitoilfosfatidilcolina ou a diestearoilfosfatidilcolina possuindo, neste caso, uma composição bem definida, particularmente no que concerne aos grupos acilo, e podem ser obtidos com cadeias hidrocarbonadas saturadas ou insaturadas, com maior ou menor número de átomos de carbono, iguais ou diferentes. Têm um comportamento facilmente caracterizável relativamente aos diversos parâmetros termodinâmicos, quando comparados com as populações heterogéneas constituintes dos fosfolípidos naturais (Lasic, D.D., 1993).

Além de fosfolípidos, os lipossomas podem incluir também outras moléculas lipídicas. O colesterol, por exemplo, é usado para reduzir a difusão dos fármacos hidrossolúveis para o exterior das vesículas, bem como para aumentar a estabilidade destas na corrente circulatória. Na bicamada fosfolipídica, as moléculas de colesterol orientam o seu grupo hidroxilo para a fase aquosa, enquanto a parte tricíclica se intercala nas cadeias acílicas dos fosfolípidos. A quantidade de colesterol incluída na bicamada fosfolipídica é variável, podendo atingir cerca de 50% da composição lipídica total (Vemuri, S. e Rhodes, C.T., 1995).

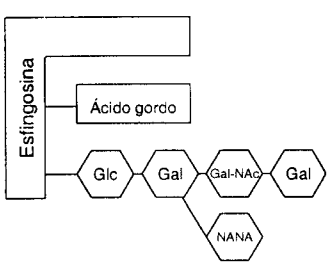
A carga eléctrica das vesículas pode também ser modificada por incorporação de moléculas anfipáticas electricamente carregadas como a estearilamida, para a obtenção de lipossomas positivos, ou o dicetilfosfato, para a obtenção de lipossomas com carga eléctrica negativa. A inclusão de um glucolípido derivado da esfingosina, mais propriamente do monossialogangliósido (GM_1), proporciona o aumento dos tempos de residência dos lipossomas na corrente circulatória (Storm, G. (Ed.), 1987) (ver Figura 1.2).



Colesterol
(5-colesteno-3β-ol)



Estearilamina
(n-octadecilamina)



Gangliosido G_{M1}
(NANA: ácido N-acetilneuramínico; Glc: glucose;
Gal: galactose; Gal-Nac: N-acetilgalactosamina)

Figura 1.2 Representação esquemática de algumas moléculas não fosfolipídicas utilizadas na preparação de lipossomas.

As bicamadas fosfolipídicas podem apresentar-se em duas fases termodinâmicas distintas, ocorrendo a transição de uma fase para outra por variação da temperatura. Com efeito, a cada fosfolípido puro disperso em água corresponde uma temperatura, denominada transição de fase (T_m), à qual as cadeias acílicas da molécula transitam de um estado de grande ordenação, estado de gel ("fase sólida"), para um estado de cristal-líquido ("fase fluida"), como está representado esquematicamente na Figura 1.3.

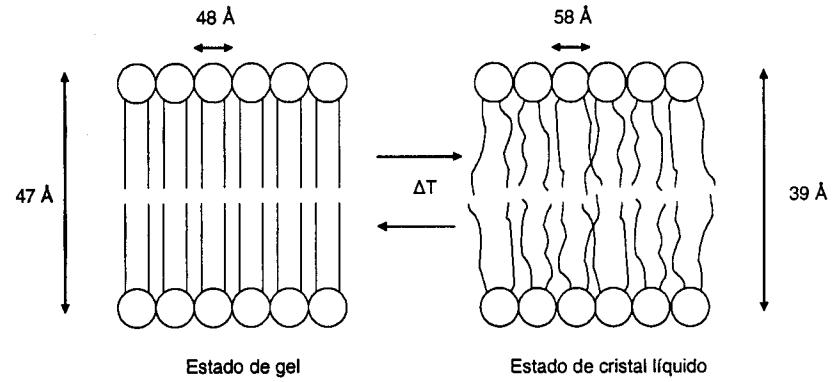


Figura 1.3 Fases termodinâmicas das bicamadas fosfolipídicas (adaptado de Storm, 1987).

Assim, quando a temperatura do sistema é inferior à T_m dos fosfolípidos constituintes de uma dada 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 de T_m aumenta consideravelmente a mobilidade das cadeias acílicas, a área ocupada por cada molécula de fosfolípido é incrementada e a espessura da bicamada diminui (New, R.R.C., 1990), (Lasic, D.D., 1993). A T_m dos fosfolípidos depende da natureza do grupo polar, bem como do comprimento e do grau de insaturação das cadeias acílicas. Em geral, aumenta com o comprimento das cadeias dos ácidos gordos esterificantes e diminui com o grau de insaturação. Para um fosfolípido puro, os valores de T_m restrigem-se a um intervalo de ± 0,5°C, mas para uma mistura o intervalo pode abranger valores de mais de ±10°C. Além disso, para certos fosfolípidos tais como a fosfatidilserina, o fosfatidilglicerol ou o ácido fosfatídico, a presença de catiões divalentes ou alterações do pH do meio podem influenciar consideravelmente os valores de T_m.

A fase em que se encontram as bicamadas lipossómicas é extremamente importante, uma vez que influencia marcadamente a estabilidade e o comportamento das vesículas no meio biológico. Todavia, o comportamento termodinâmico de uma bicamada lipossómica é alterado quando se incorporam moléculas não fosfolipídicas na membrana. Assim, o colesterol é conhecido como um modulador da fluidez, pois exerce uma pequena acção

fluidizante quando as moléculas se encontram no estado de gel e, pelo contrário, um efeito marcado de 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% (New, R.R.C., 1990). Em consequência, o colesterol reduz consideravelmente a permeabilidade das bicamadas fosfolipídicas que se apresentam fluidas à temperatura ambiente.

A diversidade de estruturas com que se apresentam os lipossomas pode ser evidenciada por microscopia electrónica. Esta variedade estrutural e morfológica deu lugar a uma classificação, cujo critério é fundamentalmente baseado no número de bicamadas existentes e na dimensão das vesículas. Outra classificação possível baseia-se no método de preparação e será oportunamente discutida.

Sem qualquer outro processamento, a dispersão de fosfolípidos em água origina vesículas multilamelares (MLV - "multilamellar vesicles", na denominação anglo-saxónica), cujos tamanhos estão geralmente compreendidos entre 0,4 e 3,5 μm. Neste caso, o espaço aquoso interno encontra-se subdividido por bicamadas esféricas concêntricas, ou por bicamadas organizadas em forma de favo, ou ainda pela existência de vesículas pequenas unilamelares englobadas por uma vesícula uni ou multilamelar de maior dimensão (Figura 1.4) (Hope, M. J. *et al.*, 1986). Apresentam um volume aquoso interno médio (1-4 l/mol de lípido) quando comparado com o dos outros lipossomas e uma elevada capacidade de encapsulação de fármacos lipofílicos (Sharma, A. e Sharma, U.S. (1997).Os lipossomas formados por uma única bicamada são classificados como vesículas unilamelares grandes (LUV - "large unilamellar vesicles") ou vesículas unilamelares pequenas (SUV - "small unilamellar vesicles"), sendo geralmente aceite o diâmetro de 100 nm como valor limite para a distinção entre estes dois tipos de vesículas.

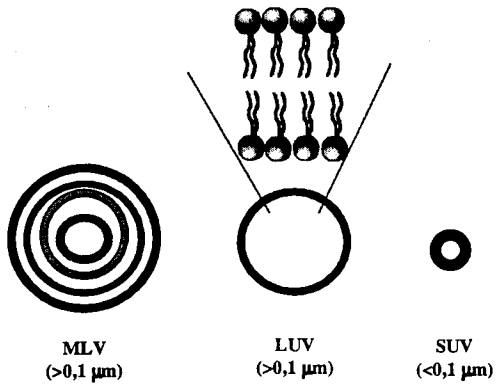


Figura 1.4 Classificação de lipossomas de acordo com o tamanho e número de lamelas.

Os LUVs possuem um volume interno aquoso elevado (7 l /mol de lípido) em contraste com o dos SUVs (0,2-1,5 l /mol de lípido), apresentando, também, uma grande capacidade de captação de macromoléculas (Sharma, A. e Sharma, U.S., 1997). São mais estáveis do que os SUVs e possuem uma maior deformabilidade, que é independente da curvatura da vesícula, bem como uma menor tensão membranar superficial (Lasic, D.D., 1993).

Relativamente aos lipossomas unilamelares o conteúdo fosfolipídico relaciona-se com a área superficial das vesículas, que é proporcional ao quadrado do raio, enquanto o volume encapsulado varia ao cubo. Por outro lado, devido à espessura da membrana, quando as vesículas se tornam mais pequenas, o seu volume interno aquoso vai sendo reduzido, visto aumentar a ocupação do espaço interno pelas moléculas fosfolipídicas (New, R.R.C., 1990).

A estrutura e a dinâmica das moléculas fosfolipídicas têm 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 relativamente à acção de moléculas endógenas e exógenas.

Nas membranas lipídicas, as moléculas de fosfatidilcolina encontram-se dispostas com o esqueleto do glicerol alinhado de forma aproximadamente perpendicular ao plano da membrana e o grupo fosfocolina numa linha que faz um ângulo de ≈30°com a superfície da membrana. É de prever que esta conformação seja também adoptada pelo fosfatidilglicerol (Boggs, J.M., 1987).

O estabelecimento de ligações de hidrogénio por parte do grupo polar fosfolipídico diminui a sua liberdade de rotação e, devido aos três grupos metilénicos ligados ao azoto quaternário, a colina forma um grupo compacto, ocupando a sua projecção num plano perpendicular ao eixo do lipossoma uma área superior à das duas cadeias hidrocarbonadas. Para compensar, estas dispõem-se numa conformação inclinada num 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 cadeias adjacentes, maximizando interacções do tipo das forças de Van der Waals (Boggs, J.M., 1987).

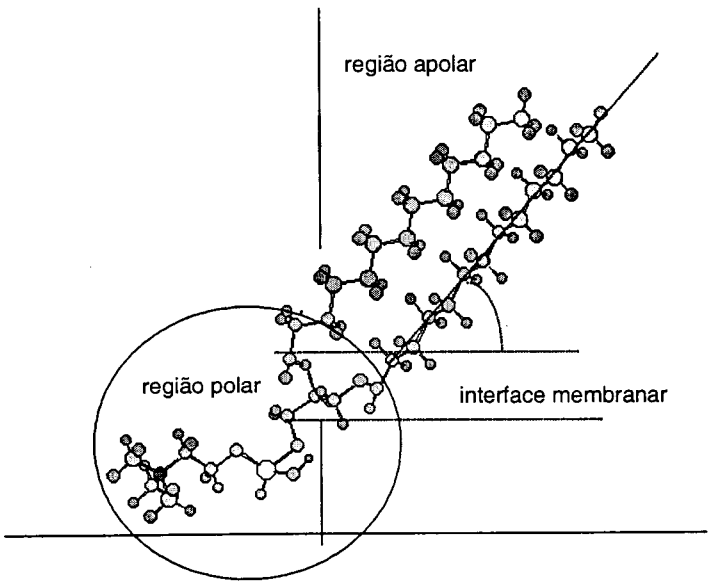


Figura 1.5 Representação esquemática de uma molécula de fosfatidilcolina, mostrando as diversas regiões e orientação molecular na região de interface lípido / água.

O grupo glicerol corresponde à zona da molécula onde o movimento é mais restrito. Também os grupos metilénicos mais próximos do grupo polar 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, ocorrendo uma diminuição da micro-viscosidade do meio (New, R.R.C., 1990).

Embora a estrutura da bicamada seja estável, as moléculas dos fosfolípidos têm um certo grau de liberdade dentro da membrana, estando as cadeias carbonadas em constante

movimento produzido pela rotação sobre as ligações C-C. As moléculas de fosfatidilcolina que compõem a bicamada apresentam movimentos moleculares variados: movimentos de rotação em torno do seu eixo, movimentação segmentar das caudas, movimentos de "flip--flop", em que há trocas de moléculas entre os dois folhetos, difusão lateral e trocas intervesiculares de fosfolípidos, como se pode observar na Figura 1.6.

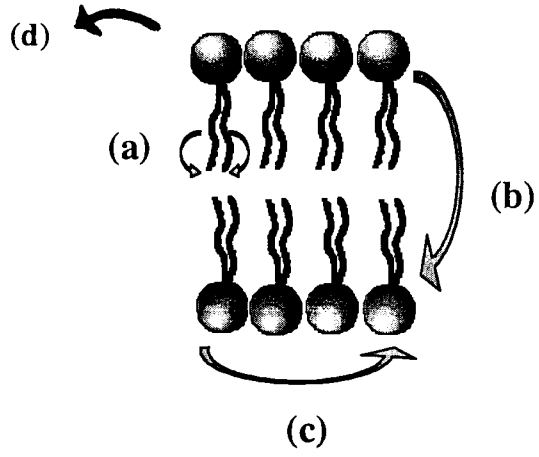


Figura 1.6 Movimentos dos fosfolípidos na bicamada membranar: (a) movimento de rotação, (b) movimento de "flip-flop", (c) difusão lateral, (d) troca intervesicular.

Uma característica interessante inerente à estrutura membranar é a sua permeabilidade. As bicamadas são permeáveis não só a moléculas hidrofóbicas, capazes de entrar e permanecer na região apolar, como a moléculas hidrofílicas de elevada polaridade. A estrutura membranar é também muito importante no que respeita às moléculas endógenas acopladas à membrana (proteínas, receptores, canais etc.), bem como no que diz respeito aos mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos farmacológicos exibidos por uma variedade de fármacos, sendo uma questão fundamental em farmacologia molecular.

2 Preparação dos lipossomas

As moléculas lipídicas, quando em solução aquosa, agregam-se formando várias estruturas de forma a minimizar a energia livre do sistema ou função de Gibbs (ΔG). A organização em agregados visa a protecção das caudas hidrofóbicas da exposição à água e

por cada grupo $-CH_2-$ e $-CH_3$ transferido para a fase apolar, ocorre uma libertação compreendida entre cerca de 700 e 2100 $calmol^{-1}$, respectivamente. Simultaneamente, a hidratação dos grupos polares também reduz ΔG e se as cabeças polares fosfolipídicas forem carregadas a contribuição é ainda maior (Lasic, D.D., 1993).

As forças intra-membranares exercidas consistem em forças hidrofóbicas, de Van der Waals, de hidratação e electrostáticas, sendo as duas primeiras forças de atracção, enquanto que as duas últimas são forças repulsivas e as responsáveis pela organização das moléculas anfifílicas em estruturas micelares e vesiculares (Lasic, D.D., 1993).

Resumindo, a variação considerável da energia 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 carbonadas.

A estrutura fosfolipídica compreende então duas cadeias hidrocarbonadas apolares e um grupo polar, o que sugere um deslocamento do equilíbrio hidrófilo-lipófilo no sentido da lipofilia, sendo a concentração de monómeros em solução aquosa extremamente baixa. Assim, os fosfolípidos orientam-se maximizando a superfície de exposição dos seus grupos polares ao meio aquoso e 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 1.7. Durante esta fase, as bicamadas estabilizam a uma distância que é determinada pelo equilíbrio entre as forças repulsivas e atractivas. A agitação do sistema provoca o destacamento das estruturas tubulares, que imediatamente se fecham e originam lipossomas (Lasic, D.D., 1993)

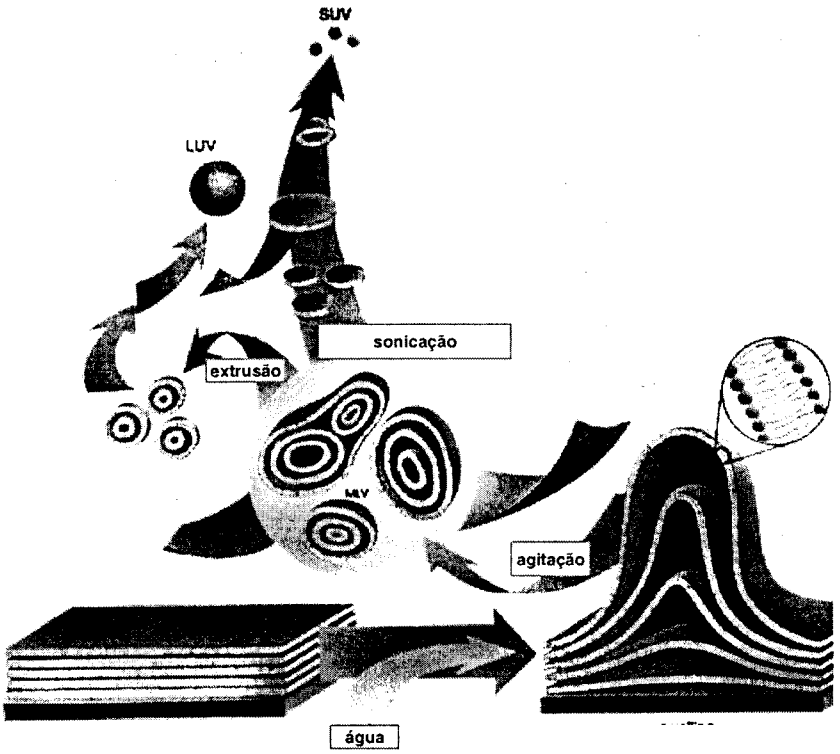


Figura 1.7 Representação esquemática da formação de lipossomas multilamelares por hidratação do filme lipídico e de lipossomas unilamelares pelos processos de extrusão e sonicação.

Dado o mecanismo da sua formação, as vesículas não são necessariamente esféricas apresentando, por vezes, uma forma oval. No entanto, ao longo do tempo estas estruturas vão adquirindo uma forma esférica, caracterizada por uma energia de curvatura mínima. Isto acontece provavelmente devido a um "flip-flop" direccional das moléculas fosfolipídicas, uma vez que o número inicial na monocamada externa deverá ser superior ao da monocamada interna.

Diversos parâmetros influenciam o processo de formação dos lipossomas, tais 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 (Barbosa, C.M.G., 1995).

Contrariamente ao que sucede com outros sistemas, que implicam manipulações químicas mais ou menos complexas para conjugarem ou incorporarem os agentes bioactivos, os lipossomas podem incorporar com relativa facilidade uma grande variedade de compostos hidro ou lipossolúveis.

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 em escala industrial.

O processo clássico, inicialmente referido por Bangham em 1965, refere a obtenção de MLVs por dispersão de um filme lipídico num meio aquoso. O filme resulta da evaporação à secura de uma solução de um lípido num solvente orgânico, geralmente efectuada em balão de fundo redondo, sob uma corrente de azoto ou árgon. A hidratação dos filmes conduz posteriormente à obtenção de preparações muito heterogéneas, contendo populações de vesículas lipossómicas com diferentes características no que respeita ao tamanho e número de bicamadas lipídicas (ver Figura 1.8).

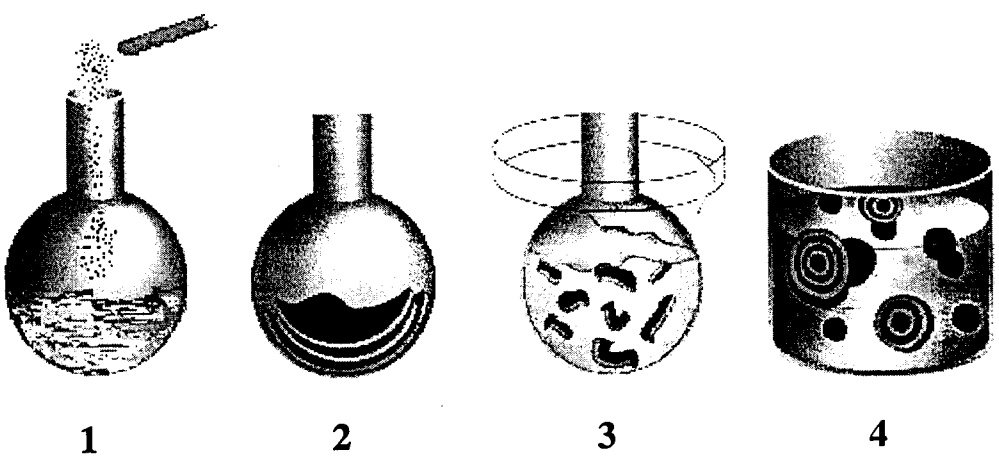


Figura 1.8 Representação esquemática da preparação de MLVs: 1) dissolução dos lípidos num solvente orgânico; 2) evaporação à secura do solvente e formação do filme lipídico nas paredes do balão. Ressuspensão do filme com uma solução aquosa; 3) agitação; 4) obtenção das vesículas multilamelares.

Este processo de preparação pode sofrer algumas variações, nomeadamente quanto ao solvente orgânico utilizado, à possível utilização de contas de vidro, à forma de secagem do lípido e aos parâmetros de agitação, tais como o tempo, a intensidade, e a temperatura de agitação (Lasic, D.D., 1993).

Um dos inconvenientes das vesículas multilamelares consiste na sua reduzida capacidade de encapsulação de compostos polares, o que pode ser obviado pela execução de ciclos de congelação-descongelação das respectivas formulações lipossómicas, que se mostrou um processo muito eficaz para aumentar o volume aquoso capturado (Castile, J.D. e Taylor, K.M.G., 1999). Os lipossomas assim obtidos são denominados FATMLV "frozen and thawed MLV" - segundo a designação anglo-saxónica.

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, fazendo lembrar as películas justapostas do bolbo da cebola, 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 (Figura 1.9).

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. A explicação para esta alteração morfológica não é clara, mas pensa-se que resulta da quebra das estruturas lamelares das MLVs por formação de cristais de gelo durante as fases de congelação (L.D.Mayer, 1985), (Hope, M.J., 1986).

Quando se pretende obter vesículas homogéneas e de tamanho bem definido, torna-se necessário efectuar processamentos adicionais nos lipossomas. Tais processamentos conduzem à obtenção de vesículas unilamelares, sendo os métodos mais difundidos a sonicação e a extrusão, embora existam outros tais como a microfluidização.

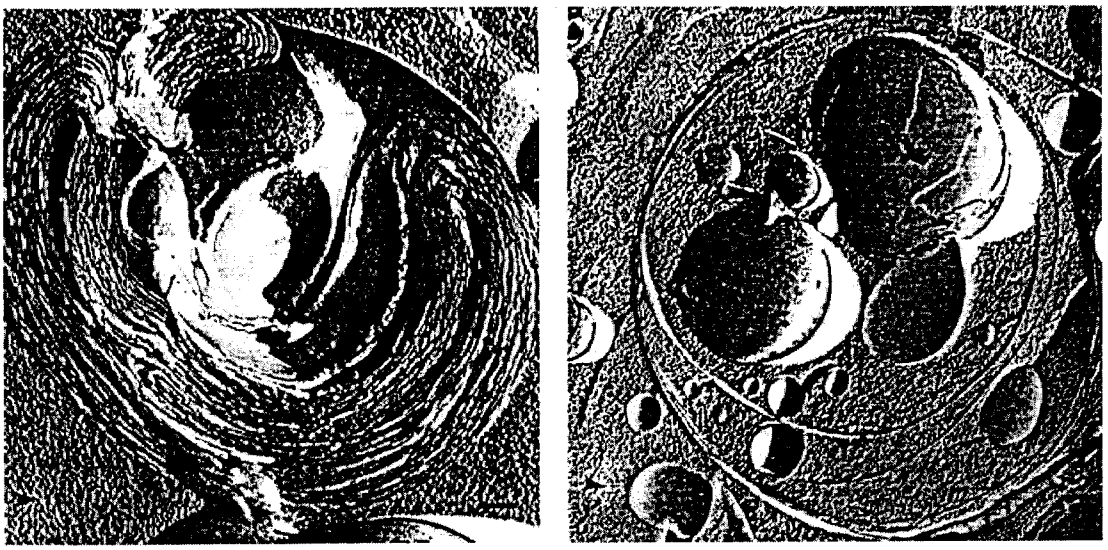


Figura 1.9 Micrografia electrónica de "freeze-fracture" de MLVs antes (A) e após (B) cinco ciclos de congelação-descongelação (Mayer, 1985).

A *sonicação* é utilizada quando se pretendem obter vesículas de reduzidas dimensões e caracteriza-se por uma elevada transferência de energia para a suspensão lipídica, podendo efectuar-se através da utilização de uma ponta de titânio ou de um banho com desintegrador ultrassónico. A ponta de titânio é utilizada para baixos volumes de suspensões lipídicas ou suspensões muito concentradas. Devido às elevadas temperaturas utilizadas e às trocas gasosas associadas à ponta de titânio existe um risco considerável de degradação dos lípidos e contaminação da suspensão com titânio.

No caso de maiores volumes de amostra são utilizados os banhos para a sonicação, em que os riscos referentes à degradação lipídica são consideravelmente diminuídos. No entanto, dado que ocorre dispersão de energia por uma área maior, torna-se impossível a obtenção de vesículas tão pequenas como as obtidas com a ponta de titânio (New, R.R.C., 1990).

O método de *extrusão*, que permite a obtenção de vesículas unilamelares, LUVs ou LUVETs (large unilamellar vesicles by extrusion techniques, segundo a literatura anglo-saxónica), baseia-se na passagem de dispersões de MLV através de membranas filtrantes de policarbonato ou celulose, de diâmetro de poro bem definido, sem a utilização de

solventes orgânicos, detergentes ou condições drásticas como as utilizadas no método de sonicação (Frisken, B.J. *et al.*, 2000).Efectua-se em ambiente de gás inerte e sob pressão moderada (< 100 psi), a uma temperatura superior à temperatura de transição de fase do(s) lípido(s) constituinte(s) da dispersão (Nayar, R., 1989), devendo ser executadas aproximadamente 10 passagens consecutivas pelo filtro, para que ocorra a redução do número de lamelas e se obtenha uma suspensão homogénea de lipossomas unilamelares com elevada eficiência de encapsulação (Nayar, R., 1989), (Hope, M.J. *et al.*, 1985), ver Figura 1.10.

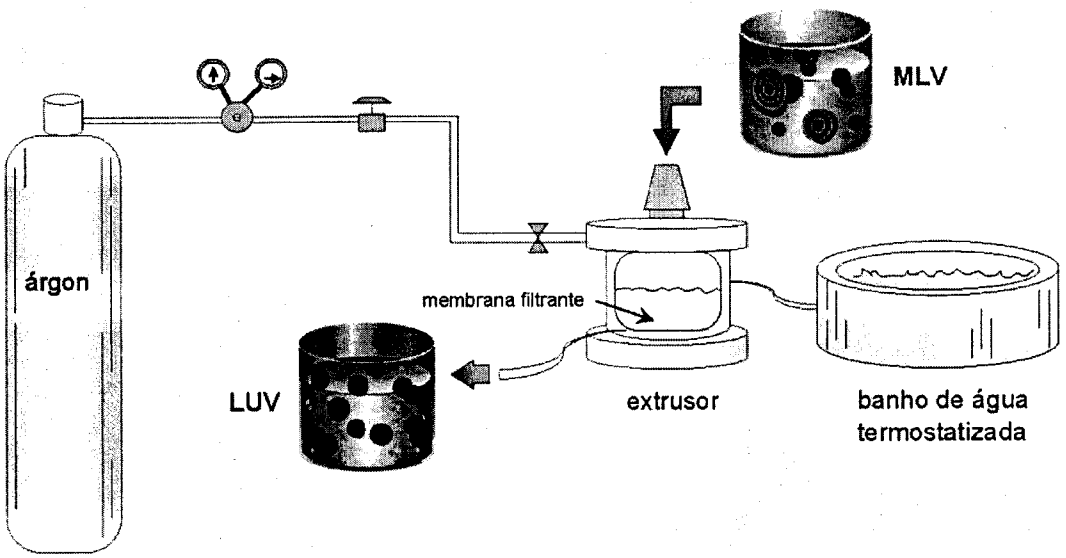


Figura 1.10 Representação esquemática do processo de extrusão para a obtenção de LUVs.

O diâmetro final das vesículas depende do tamanho de poro das membranas e das características do próprio lípido, não sendo possível a obtenção de vesículas com diâmetro inferior a 50-60 nm (Lasic, D.D., 1993).

Relativamente à *microfluidização* é utilizado um aparelho denominado micro-fluidizador para a preparação dos lipossomas. A suspensão de MLVs é introduzida num reservatório e bombeada a pressão elevada para uma câmara de interacção, onde é separada em duas correntes que colidem posteriormente uma com a outra a grande

velocidade. As vesículas são fraccionadas em vesículas mais pequenas e recolhidas ou recicladas várias vezes com vista à redução do seu tamanho. Este método permite elevados níveis de produção e tem a vantagem de possibilitar o processamento de amostras muito concentradas em lípidos (20% ou mais em peso), cuja manipulação é impossível pelos métodos convencionais. Este processo permite a obtenção de lipossomas com elevados percentagens de encapsulação, sendo muito eficiente no que respeita à encapsulação de materiais hidrossolúveis (New, R.R.C., 1990).

São também muito utilizados três outros métodos de preparação de lipossomas que não implicam a formação de um filme lipídico – o de injecção, o de evaporação em fase reversa e o de desidratação/re-hidrataçção. No *método de injecção* procede-se à injecção rápida de uma solução de um solvente orgânico (etanol ou éter) contendo o lípido numa solução aquosa, através de uma agulha fina (Lasic, D.D., 1993). Este procedimento origina uma população muito elevada de SUVs de 20 a 30 nm de diâmetro. A simplicidade e a ausência de processamentos físicos potencialmente prejudiciais constituem as principais vantagens deste método, sendo a principal desvantagem a remanescência de vestígios de solvente orgânico na fase aquosa, que terão que ser removidos por diálise ou filtração em gel (Lasic, D.D., 1993).

No método de evaporação em fase reversa, a fase aquosa que contém o fármaco é emulsionada na presença de fosfolípidos dissolvidos num solvente volátil imiscível com a água. A evaporação do solvente, sob vácuo moderado, interrompida por agitações fortes para quebrar as estruturas gelificadas, produz lipossomas fundamentalmente do tipo LUV. As vesículas preparadas por eveporação em fase reversa (REV-"reverse-phase evaporation vesicles", na denominação anglo-saxónica) são na sua maioria unilamelares e têm a particularidade de apresentar eficácias de encapsulação relativamente elevadas para fármacos polares que não estabelecem interacções com a bicamada lipídica.

A técnica de desidratação/re-hidratação envolve a liofilização de lipossomas multilamelares ou unilamelares dispersos num meio aquoso que contém o fármaco a incorporar. Segue-se uma re-hidratação controlada, obtendo-se MLVs com elevadas eficácias de incorporação (DRV-"dehydration-rehydration vesicles", na denominação anglo-saxónica) (Lasic, D.D., 1993).

Além dos métodos referidos atrás e que proporcionam a encapsulação passiva das substâncias durante o processo de formação dos lipossomas há, também, processos de encapsulação activa. Estes métodos baseiam-se no facto da encapsulação se processar em resposta a um gradiente de pH entre o interior e o exterior das vesículas, alcançando-se elevadas eficácias de encapsulação para numerosos princípios activos (New, R.R.C., 1990). Em função dos lípidos utilizados e do método de preparação adoptado, obtêm-se lipossomas que podem diferir quanto ao tamanho, estrutura, carga eléctrica de superfície, composição e fluidez da membrana.

2.1 Selecção de sistemas lipossómicos

A selecção do sistema lipossómico apropriado para o transporte de um determinado fármaco *in vivo* ou para a execução de estudos biomembranares, dependerá da utilização proposta bem como dos fármacos utilizados. No caso de fármacos lipossolúveis a incorporação lipossómica ocorre ao nível das regiões hidrocarbonadas da membrana e estará relacionada sobretudo com a concentração de lípido e menos com o tamanho dos lipossomas utilizados. Neste caso, as vesículas multilamelares constituem a escolha mais evidente.

Relativamente aos fármacos hidrófilos, estes podem ser incorporados no compartimento aquoso dos lipossomas, pelo que a quantidade incorporada será proporcional ao volume da fase aquosa intravesicular, ou podem ligar-se à superfície membranar na região polar das moléculas fosfolipídicas (ver Figura 1.11). Os LUVs serão então os mais indicados, dado apresentarem uma elevada relação volume / superfície (Cullis, P.R. *et al.*, (1987).

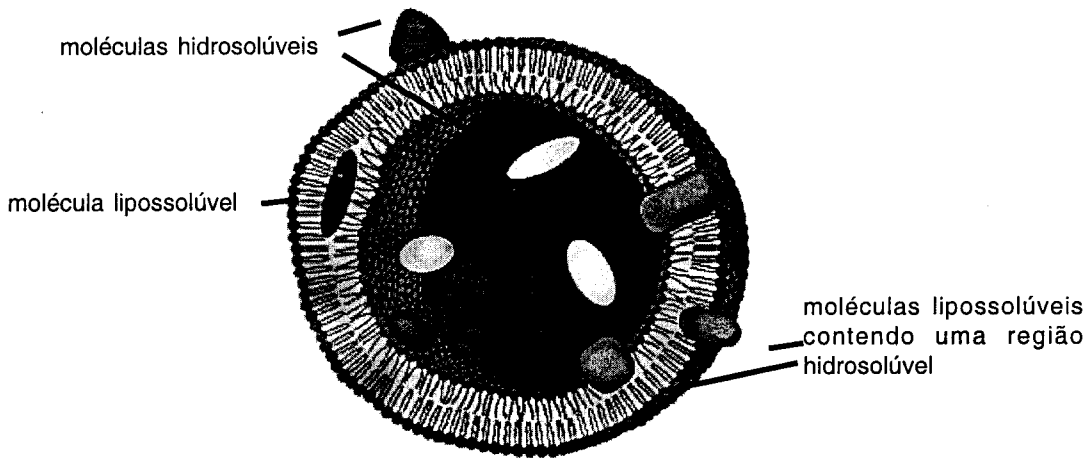


Figura 1.11 Representação esquemática de uma vesícula unilamelar e das possíveis localizações dos fármacos (adaptado de Lasic, 1993).

As moléculas lipossolúveis contendo uma região hidrossolúvel localizam-se na membrana com a região polar ao nível das cabeças e a região apolar ao nível das caudas fosfolipídicas.

Quanto à libertação dos fármacos, os MLVs permitem uma libertação sustentada, visto as membranas sofrerem uma degradação gradual no local de acção. Por outro lado, as vesículas unilamelares são mais indicadas quando se pretende uma transferência rápida dos fármacos que transportam (Mayer, L.D. *et al.*, 1986).

Destinando-se à via parentérica, as dispersões lipossómicas devem apresentar-se estéreis e apirogénicas. Os lipossomas de menores diâmetros (<0,2 μm) podem ser esterilizados por filtração em condições de assepsia, enquanto os maiores devem ser preparados por técnica asséptica, usando matérias primas estéreis (Lasic, D.D., 1993). No que respeita aos pirogénios é possível obter formulações lipossómicas com níveis suficientemente baixos e aceitáveis, usando matérias primas isentas de pirogénios, assegurando um nível reduzido de contaminação durante a preparação e obedecendo rigorosamente às Boas Práticas de Fabrico.

Quando a utilização dos lipossomas visa a simulação dos sistemas naturais, as vesículas devem possuir propriedades bem definidas com vista à compreensão do impacto de cada factor na membrana. Aos LUVs tem sido atribuído um maior interesse prático pois apresentam uma única membrana e um volume interno de solução aquosa razoavelmente elevado, ao contrário dos SUVs, que devido à elevada curvatura possuem anormalidades no empacotamento dos lípidos, tornando-se muito sensíveis à degradação na presença de moléculas biológicas (Hope, M.J. *et al.*, 1985). A utilização dos SUVs é vantajosa quando se requerem estruturas muito homogéneas, sem necessidade de uma encapsulação eficiente, pois apresentam uma elevada relação superfície/volume facilitando os estudos de superfície (Woodle, M.C. e Papahadjopoulos D., 1997).

3 Estabilidade dos lipossomas

Em trabalhos de investigação nas áreas da bioquímica e biofísica, ou ainda na optimização de uma formulação lipossómica sob o ponto de vista galénico e respectiva caracterização físico-química, são normalmente usados lipossomas recém-preparados. No entanto, tal é impensável se a pretensão for optimizar lipossomas para fins farmacêuticos, dado que o prazo de validade exigido em formulações comerciais deve ser de, pelo menos, dois anos e portanto, sendo os lipossomas sistemas heterogéneos susceptíveis de sofrer alterações de natureza química, física e biológica (Storm, G. e Crommelin, D.J.A., 1998), a estabilidade ganhou uma grande relevância na última década (Cruz, M.E.M., 1999).

Do ponto de vista *físico*, e apesar da estrutura lipossómica constituir um estado termodinamicamente favorável para a dispersão dos fosfolípidos em água, praticamente nenhum lipossoma se forma espontaneamente, sendo necessário o fornecimento de energia para a sua produção. Este estado lipossómico metaestável com o decorrer do tempo e dependendo da constituição lipídica, bem como do meio envolvente, pode sofrer agregação, fusão e ruptura membranar, levando à formação de estruturas heterogéneas de diferentes

dimensões e, no caso de encapsularem solutos, à perda do seu conteúdo (New, R.R.C., 1990), (Lasic, D.D., 1993). Contudo, se preparados e armazenados sob condições bem específicas e não submetidos a degradação química, os lipossomas podem manter-se em solução durante anos. 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, as alterações dos fosfolípidos relacionam-se com a ocorrência quer de reacções de hidrólise nas ligações éster, originando ácidos gordos livres e lisofosfolípidos, quer de reacções de oxidação nas cadeias acílicas, quando estas são insaturadas, que ocorrem na ausência de oxidantes específicos por um mecanismo de radicais livres, conduzindo ao aparecimento de duplas e triplas ligações conjugadas, peróxidos e aldeídos (New, R.R.C., 1990).

A avaliação da degradação por fenómenos de oxidação pode efectuar-se por espectrofotometria de ultravioleta-visível. Este é um método simples que permite a detecção do aparecimento de dienos conjugados, que apresentam um pico de absorvância a 230 nm. Uma degradação mais acentuada dos fosfolípidos é assinalada pelo aparecimento de um terceiro pico a 270 nm devido à formação de trienos conjugados (ver Figura 1.12). ~

A hidrólise é fortemente afectada pela temperatura e pelo pH do meio, verificando-se que ocorre em menor extensão para valores de pH próximos de 6,5, enquanto a força iónica parece não exercer uma grande influência neste processo. 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. Além disso, os lisofosfolípidos exibem efeitos hemolíticos e tóxicos *in vitro* e *in vivo* e, em concentrações elevadas, afectam consideravelmente as propriedades das bicamadas fosfolipídicas, desestabilizando-as e aumentando a sua permeabilidade (Weltzien, H. V., 1979), (Wang, A. e Dennis, E.A., 1999).

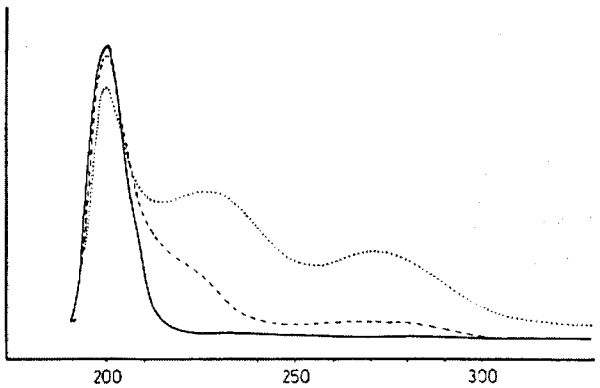


Figura 1.12 Espectros de UV-Vis da fosfatidilcolina (—), da fosfatidilcolina moderadamente oxidada (---) e da fosfatidilcolina fortemente oxidada (·····). Adaptado de (New, R.R.C., 1990).

No que respeita à *degradação biológica* é necessário ter em consideração que as formulações lipossómicas são geralmente emulsões, cuja fase contínua corresponde à fase aquosa, facilmente sujeita a contaminação microbiológica. De modo a obviar a referida degradação, a manipulação dos lipossomas deve efectuar-se sob condições asséptica e o seu armazenamento deve ser feito a temperaturas reduzidas.

Relativamente à estabilidade física, sabe-se que a agregação e sedimentação das vesículas neutras se deve essencialmente a interacções de Van der Walls, mais pronunciadas nas vesículas multilamelares, pelo que uma das formas de reduzir este processo consiste na inclusão de uma quantidade reduzida de fosfolípidos carregados negativamente na mistura lipídica. As vesículas unilamelares de tamanho reduzido (diâmetro inferior a 40 nm) também se fundem com facilidade, de forma a obviar a tensão da curvatura pronunciada que é apresentada pelas suas membranas. 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 no meio de suspensão (New, R.R.C., 1990).

A utilização de fosfolípidos saturados de elevada pureza reduz significativamente os processos de oxidação, bem como a utilização de substâncias anti-oxidantes e a preparação e a conservação em ambientes com baixo teor de oxigénio, conseguidos através da injecção

de árgon ou azoto. Quanto aos processos hidrolíticos, eles podem ser minimizados conservando as formulações a baixas temperaturas (4 °C) e a um pH próximo da neutralidade.

4 Métodos de caracterização dos lipossomas

As características físicas e químicas dos lipossomas, tais como o tamanho, número de lamelas, 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 destinados à análise morfológica dos lipossomas, sendo os mais importantes agrupados nas seguintes categorias: microscópicos, espectroscópicos, de difracção e correlação fotónica, termodinâmicos e hidrodinâmicos (Lasic, D.D., 1993). Segue-se a sua descrição sucinta, dando maior ênfase à técnica de espectroscopia de correlação fotónica e potencial-zeta, não só por terem sido as únicas utilizadas neste trabalho, mas também porque os parâmetros obtidos pela aplicação dos métodos restantes se encontram bem documentados na literatura.

Microscópicos. São várias as técnicas de microscopia que permitem a investigação visual directa dos lipossomas. Quanto à microscopia óptica destacam-se as técnicas de microscopia de campo brilhante e a microscopia de contraste de fase. Com uma resolução inferior a 0,3 μm permitem o estudo de LUVs e MLVs de elevadas dimensões. As observações ópticas directas podem possibilitar a obtenção de informações acerca do tamanho, homogeneidade da amostra e número de lamelas das vesículas.

A microscopia electrónica de transmissão, por seu lado, requer uma preparação complicada das amostras, que são analisadas sob vácuo e têm que apresentar condutividade eléctrica. As técnicas mais utilizadas consistem na técnica de coloração negativa e na de "freeze-fracture", que permitem uma resolução de aproximadamente 10-20 Å. Nos dois casos, os métodos de preparação das amostras podem produzir artefactos, durante as fases de secagem e/ou de arrefecimento dos sistemas (Lasic, D.D., 1993).

Recentemente, a introdução da criomicroscopia permitiu a observação directa de lipossomas na sua forma hidratada. As técnicas de microscopia electrónica de varrimento (SEM - "scanning electron microscopy") e de microscópio de campos fracos (AFM - "atomic force microscopy") são também muito utilizadas, permitindo a técnica de AFM maiores resoluções, nomeadamente na análise de moléculas individuais das membranas lipossómicas.

Espectroscópicos. Praticamente todas as técnicas espectroscópicas são utilizadas na análise das vesículas lipossómicas. A espectrofotometria permite, em muitos casos, o acompanhamento dos processos de encapsulação de diversas substâncias pelas vesículas. A turbidimetria possibilita, após elaboração de curvas de calibração, uma estimativa qualitativa do tamanho e da concentração dos lipossomas, visto que a turbidez está relacionada com a dispersão de Rayleigh isto é, a intensidade da luz dispersa (I) é proporcional ao comprimento de onda, $I \propto \lambda^{-4}$.

A espectroscopia vibracional (infravermelho e Raman) são usadas no estudo da estrutura e dinâmica das cadeias hidrocarbonadas.

As técnicas de RMN e de EPR são também muito utilizadas na análise de sistemas membranares, fornecendo informações acerca da conformação, temperatura de transição de fase e constantes de difusão, bem como do tamanho, número de lamelas, permeabilidade da membrana, movimentos de "flip-flop", entre outros. As técnicas de EPR, utilizando iões paramagnéticos, são também amplamente utilizadas na determinação do volume interno dos lipossomas (Lasic, D.D., 1993).

Métodos de difracção e de correlação fotónica. Estes métodos permitem a obtenção de informações acerca da estrutura e tamanho dos lipossomas. Os métodos de difracção de raios-X e de difracção de neutrões fornecem dados relativos à espessura das membranas, enquanto que a granulometria dos lipossomas pode ser avaliada por espectroscopia de correlação fotónica (denominada na literatura anglo-saxónica por "quasielastic laser light scattering" ou "dynamic light scattering"). Neste trabalho foi utilizado um aparelho equipado

com uma fonte de radiação laser num ângulo fixo de 90°, adequado para analisar com precisão o tamanho de partículas homo ou heterogéneas num curto espaço de tempo. A sua representação esquemática encontra-se na Figura 1.13.

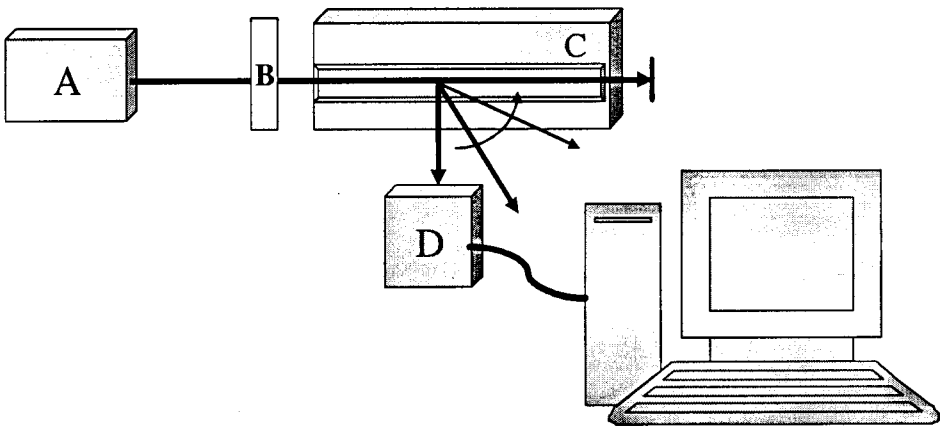


Figura 1.13 Representação esquemática do equipamento usado para a determinação do diâmetro dos lipossomas (Malvern Zeta Sizer 5000): A - Fonte de raios laser; B - Lente; C - Célula contendo a amostra; D - Fotomultiplicador.

Segundo este método, os diâmetros são determinados através da medição da dispersão provocada na radiação laser incidente por parte das vesículas em suspensão. Uma vez que estas não são estáticas, mas apresentam movimentos brownianos, a difracção da luz varia no tempo em função do coeficiente de difusão (D) do meio de dispersão (Hope, M.J. *et al.*, 1986). Assim, as variações da intensidade da difracção da luz são tanto mais rápidas quanto menores forem as vesículas em suspensão.

Um conjunto de lentes instaladas no sistema torna paralelos os feixes luminosos resultantes da difracção, que são recebidos por um fotomultiplicador. O sinal recebido é proporcional à intensidade da luz que, por sua vez, se relaciona com o tamanho das partículas em suspensão através dos ângulos respectivos de difracção da radiação. A correlação foi efectuada por um correlador 7132 "multi-bit" com 256 canais, cada um recolhendo e analisando dados a diferentes tempos de amostragem. Assim, o coeficiente de difusão translaccional (D) pode ser determinado e, juntamente com a temperatura e a viscosidade do líquido de

suspensão, pode ser usado para determinar o raio hidrodinâmico médio ($\overline{R_h}$) das partículas, assumindo a sua esfericidade, através da equação de Stokes-Einstein:

$$D = KT / 6\pi\eta\overline{R_h}$$

em que K é a constante de Boltzmann (1,38x10^{-16} erg/K), T é a temperatura absoluta e η é a viscosidade do meio.

De acordo com o preconizado por Talsma (Talsma H. *et al.*, 1991), utilizaram-se os valores referentes à água pura que constam do programa de aquisição e análise dos dados, sendo o valor do índice de refracção do meio 1,330 e o valor da viscosidade do meio 0,890x10^{-3} Pa.s. Estes valores proporcionam a conversão dos resultados correspondentes à variação temporal da intensidade da difracção de luz em tamanho das vesículas e possibilitam o respectivo tratamento estatístico, para o cálculo do diâmetro médio dos lipossomas em suspensão, do perfil da distribuição granulométrica e do índice de polidispersão (New, R.R.C., 1990).

Métodos hidrodinâmicos. A cromatografia de exclusão em gel é um dos métodos mais utilizados para a caracterização dimensional das vesículas lipossómicas no entanto, recentemente, uma técnica análoga utilizando um sistema de HPLC (cromatografia líquida de alta pressão) tornou-se igualmente disponível.

Outros métodos hidrodinâmicos de caracterização das vesículas baseiam-se na determinação da viscosidade e do potencial-zeta, que informa acerca do potencial de membrana das vesículas lipossómicas.

O potencial-zeta, ou mobilidade electroforética dos lipossomas, foi determinado neste trabalho usando o equipamento referido no estudo da granulometria (ver Figura 1.13). Recorreu-se à utilização de uma célula munida de dois eléctrodos, que criam um campo eléctrico no qual se movem as partículas em suspensão com maior ou menor velocidade segundo a sua carga e que interagem com as barras de interferência geradas pelo

cruzamento de dois raios laser, causando dispersão de luz que é medida por um fotomultiplicador focado para o ponto de confluência dos lasers (ver Figura 1.14).

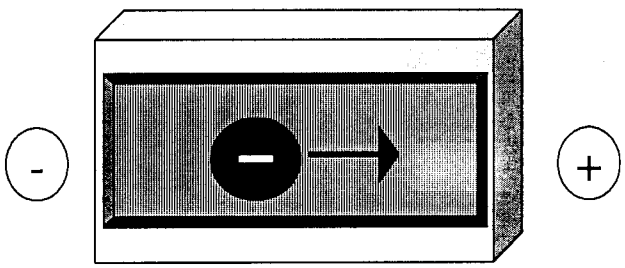


Figura 1.14 Célula pertencente ao equipamento de espectroscopia de correlação fotónica, com representação esquemática do padrão das barras de interferência, dos dois eléctrodos e de uma partícula lipossómica da amostra carregada negativamente.

A contagem dos fotões baseia-se no efeito de Doppler ("Laser Doppler Electrophoresis") e permite a elaboração de um espectro de frequência, a partir do qual o potencial-zeta das partículas pode ser calculado.

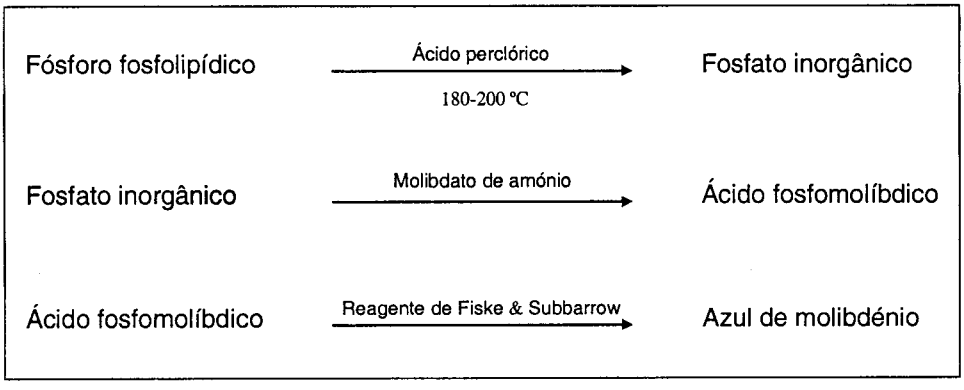
A centrifugação é também um método hidrodinâmico muito utilizado, fornecendo informações semelhantes às obtidas por correlação fotónica, (Lasic, D.D., 1993).

5 Doseamento dos lípidos

Os métodos frequentemente utilizados para a quantificação de fosfolípidos são geralmente métodos indirectos, nos quais se procede ao doseamento do fosfato contido nas amostras (New, R.R.C., 1990).

Método de Bartlett. É um método muito sensível e que permite a quantificação de concentrações de fosfato inferiores a 30 $nmol.ml^{-1}$ (Bartlett, G.R.J., 1959). O método baseia-se na mineralização do fósforo fosfolipídico a fosfato inorgânico, usando como agente oxidante o ácido perclórico a 70%. O fosfato é depois convertido em ácido fosfomolíbdico por adição de uma solução de molibdato de amónio e, finalmente, reduzido quantitativamente a azul de molibdénio por adição de reagente de Fiske & Subbarrow (New, R.R.C., 1990).

A intensidade da cor azul das soluções é então medida espectrofotometricamente a 830nm, usando água desmineralizada como referência. Juntamente com as amostras preparam-se também soluções padrão de diidrogenofosfato de potássio, de modo a elaborar uma recta de calibração através da qual se determinam as concentrações das amostras.



Esquema 1.1 Reacções envolvidas no doseamento colorimétrico dos fosfolípidos.

Os fosfolípidos utilizados na preparação dos lipossomas, nomeadamente a fosfatidilcolina e o fosfatidilglicerol, contêm exactamente uma mole de fósforo por mole de fosfolípido, de modo que a concentração em fosfolípidos é obtida directamente a partir da medição da quantidade de fósforo das amostras (New, R.R.C., 1990).

Método de Stewart. Este método baseia-se na capacidade dos fosfolípidos formarem complexos com o tiocianoferrato(II) de amónio em soluções orgânicas. Utiliza-se então um factor de conversão para transformar os valores de absorvância em miligramas de fosfolípido. Visto que o factor de conversão difere de acordo com os diferentes fosfolípidos, este método não pode aplicar-se a amostras contendo misturas de fosfolípidos cujas proporções são desconhecidas.

Método colorimétrico enzimático. Foi descrito por Trinder (Trinder, P., 1969) e por Takayama (Takayama, M. *et al.*, 1977) e 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.

6 Áreas de aplicação dos lipossomas

Ao longo dos últimos trinta anos os lipossomas têm despertado muito interesse em diversas áreas das ciências, tendo como resultado a publicação de centenas de artigos originais e de revisão, bem como diversos livros sobre o tema (Lasic, D.D., 1993), (Sharma, A. e Sharma, U.S., 1997), (Cruz, M.E.M., 1999). As principais áreas de aplicação dos lipossomas encontram-se sumariadas na Tabela 1.1.

Tabela 1.1 Principais áreas científicas de aplicação dos lipossomas (adaptado de Lasic, D.D., 1993)

Área Científica	Aplicação
Matemática	Topologia de superfícies bidimensionais no espaço tridimensional
Física	Estudo do comportamento de agregação, tamanho, variação de tamanho e forças mecânicas dos materiais
Biofísica	Permeabilidade e estudos da transição de fase em duas dimensões
Química-Física	Comportamento coloidal de sistemas com características físicas bem definidas
Química	Processos de recuperação, separação, catálise e conversão de energia
Bioquímica	Modelos membranares
Biologia	Modelos membranares (reconstituição de sistemas de transporte biológico)
Cosmética	Hidratação e regeneração da pele
Terapia e Diagnóstico	Funções celulares, transporte, acção e libertação controlada dos fármacos

6.1 Lipossomas como modelos biomembranares

A utilização dos lipossomas como modelos membranares no âmbito das áreas da química, bioquímica, biologia entre outras, advém da sua semelhança estrutural com as membranas celulares, lembrando igualmente " um mar de fosfolípidos", segundo o modelo de Singer e Nicholson (New, R.R.C., 1990). Este modelo descreve a membrana celular como

uma bicamada lipídica incrustada de proteínas e glicoproteínas, integradas ou periféricas, que estão intimamente relacionadas com as funções específicas da membrana (Jones, M.N. e Chapman D., 1995).

Sabe-se que a interacção de diversos fármacos com as membranas lipídicas constitui um passo fundamental para a sua actividade farmacológica, como é o caso de anestésicos locais (Papahadjopoulos, D. *et al.*, 1975), antibióticos (Di Giulio, A. *et al.*, 1989), bloqueadores–β (Rhodes, D.G. *et al.*, 1992), fármacos anticancerígenos (Wright, S. *et al.*, 1990), entre outros. Nestes casos, é evidente a importância não só da localização adequada dos fármacos nas membranas, para que ocorra interacção com os locais activos dos receptores membranares, como da força de ligação dos fármacos às membranas lipídicas, fenómeno quantificado pelo coeficiente de partição (Mason, R.P. *et al.*, 1991). É na dificuldade de execução deste tipo de estudos *in vivo,* ou em culturas celulares, que reside a importância da utilização dos lipossomas apoiada, portanto, na possibilidade de obtenção de estruturas mais ou menos simples, em tudo idênticas aos complexos sistemas naturais, que permitem o estudo de uma vasta gama de processos biológicos.

A capacidade dos lipossomas solubilizarem moléculas, compartimentarem reagentes de solubilidade diferente em microambientes distintos e de funcionarem como catalizadores de inúmeras reacções químicas, faz destas estruturas uma interessante alternativa aos meios reaccionais habitualmente usados em técnicas analíticas. Possuem ainda capacidade para estabilizar e proteger moléculas sensíveis à luz, bem como favorecer processos fotoquímicos e fotofísicos (Lasic, D.D., 1993).

6.2 Lipossomas como vectores de fármacos

Os recentes avanços nas áreas das ciências biomédicas têm conduzido à utilização dos lipossomas nas mais variadas terapias, profilaxias e meios auxiliares de diagnóstico, designadamente (Sharma, A. e Sharma, U.S., 1997), (Cruz, M.E.M., 1999), (Gulati, M. *et al.*, 1998), (Pinto-Alphandary, H. *et al.*, 2000), (Gregoriadis, G., 2001):

- terapia antimicrobiana contra infecções virais, bacterianas e protozoárias;
- terapia anticancerígena, com diversos fármacos, proteínas e imunomodeladores;
- terapia génica, através do transporte de DNA e de oligonucleótidos;
- terapia de doenças metabólicas, através da substituição ou suplemento de enzimas deficitárias;
- terapia hormonal de substituição;
- desintoxicação, através de agentes quelantes capazes de remover os metais acumulados nos tecidos;
- transfusões, através da aplicação de hemossomas (lipossomas com hemoglobina);
- vacinas, através da aplicação de lipossomas como adjuvantes imunológicos dos antigénios;
- visualização de metástases, através da incorporação de materiais de contraste e de isótopos radioactivos;
- terapia tópica (oftálmica e dérmica);

Os estudos intensivos ao longo dos anos levaram ao conhecimento preciso do modo de interacção de muitos fármacos com as membranas celulares e ao desenvolvimento de formulações baseadas em lipossomas, ou estruturas de base lipídica, que permitiram um incremento do índice terapêutico, resultante quer do aumento da actividade terapêutica, quer como da redução da toxicidade. Na Tabela 1.2 estão indicadas algumas formulações lipossómicas comercializadas ou em fase de ensaio clínico.

Tabela 1.2 Algumas formulações lipossómicas (adaptado de (Sharma, A. e Sharma, U.S., 1997), (Cruz, M.E.M., 1999), (Barbosa, C.M.G., 1995)).

Agentes Bioactivos	Aplicações	Fase de desenvolvimento	Companhia
Anfotericina B (AmBisome)	Infecção fúngica	Aprovado e comercializado	NeXstar
Daunorrubicina (DaunoXome)	Sarcoma de Kaposi	Aprovado e comercializado	NeXstar
Virus da doença de Newcastle	Vacina	Aprovado e comercializado	IGI
Doxorrubicina (Doxil)	Sarcoma de Kaposi	Aprovado e comercializado	SEQUUS
Nistatina	Infecção fúngica	Teste clínico	Anorex
Anamicina	Cancro da mama	Teste clínico	Anorex
Viriões da Hepatite A	Vacina	Aprovado na Suiça	Vacine Inst.
Amicacina (Mycasome)	Antibacteriano	Teste clínico	NeXstar
Gentamicina	Antibacteriano	Teste clínico	TheLipossome Comp.
Isótopo do Índio (^{111}In)	Radiologia	Teste clínico	Vestar

Quando um fármaco é administrado sob a forma lipossómica, o seu comportamento farmacocinético, nomeadamente a sua biodistribuição, difere consideravelmente do exibido pela respectiva forma livre, passando a ser determinado pelas características físico-químicas das vesículas. Tal facto pode proporcionar diversas vantagens, algumas das quais foram já referidas, tais como: (a) redução da toxicidade (p.ex., daunorrubicina e anfotericina B) (Sharma, A. e Sharma, U.S., 1997); (b) aumento do tempo de residência do fármaco na corrente sanguínea, particularmente quando este é sujeito a um rápido catabolismo (p.ex., citarabina); (c) diminuição da dose efectiva dos fármacos (p.ex., metotrexato); e (d) possibilidade de alcançar concentrações intracelulares elevadas de princípios activos (p.ex., compostos de antimónio pentavalentes). Finalmente, os lipossomas constituem veículos particularmente adequados para o transporte de fármacos lipófilos cuja administração, de outro modo, oferece dificuldades (p.ex., paclitaxel) (Wenk, M.R. *et al.*, 1996).

7 Composição fosfolipídica das vesículas lipossómicas utilizadas

A natureza e densidade de carga da superfície das vesículas lipossómicas são parâmetros importantes que influenciam o mecanismo e extensão das interacções lipossoma-célula, bem como permitem um estudo mais aproximado do modo como se processam as interacções dos fármacos com as membranas celulares (Sharma, A. e Sharma, U.S., 1997). Na maior parte dos casos, os lipossomas neutros não interactuam de modo significativo com as células ao contrário dos que possuem uma superfície carregada, principalmente no que se refere aos lipossomas aniónicos que são reconhecidos por diversos receptores encontrados numa grande variedade de células, incluindo macrófagos (Katragadda, A. *et al.*, 2000), (Miller, C.R. *et al.*, 1998).

Da vasta gama de fosfolípidos, naturais e sintéticos, disponíveis actualmente no mercado, optou-se pelos fosfolípidos sintéticos para a preparação dos lipossomas utilizados nos ensaios efectuados. Recorreu-se à dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) e ao dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG) de modo a obter vesículas neutras e carregadas negativamente, aspecto importante no que se refere ao estudo de mimetização das membranas celulares e ao estabelecimento da importância relativa das interacções, não só hidrofóbicas como também electrostáticas, entre fármacos e membranas.

Em condições fisiológicas, a maior parte das membranas celulares apresenta carga negativa devido à presença na sua constituição de fosfolípidos aniónicos. Estes têm sido, por isso, integrados na preparação de membranas, utilizadas não só como modelos membranares mas também como vectores de fármacos. O fosfatidilglicerol é o fosfolípido aniónico mais abundante das membranas celulares dos procariotas e tem sido estudado exaustivamente como modelo membranar carregado (Riske, K.A. *et al.*, 1999).

Capítulo 2 ASPECTOS GERAIS SOBRE A ACÇÃO DE ALGUNS FÁRMACOS: IMPORTÂNCIA DA INTERACÇÃO COM LIPOSSOMAS

A acção dos fármacos divide-se geralmente em duas fases: fase farmacocinética e fase farmacodinâmica. A primeira compreende os processos de absorção, distribuição, metabolismo e eliminação. A fase farmacodinâmica inclui os processos biológicos envolvidos na interacção dos fármacos com os seus alvos de acção (receptores, enzimas, etc.).

Enquanto as atenções se encontraram voltadas para a interacção fármaco-receptor, a fase de distribuição foi subestimada. No entanto, devido à complexa estrutura das membranas biológicas, a interacção com os compostos bioactivos pode ser ainda mais complexa do que os próprios mecanismos que governam as interacções ligando-receptor. De facto, antes de exercer o seu efeito e para que seja produzida uma resposta terapêutica válida, os fármacos têm que atingir os seus locais alvo numa concentração suficiente para permitir actividade biológica (Panchagnula, R. e Thomas, N.S., 2000), (Mayer, L.D., *et al.*, 1986).

O comportamento farmacocinético de um fármaco depende directamente das suas propriedades físico-químicas e da sua estrutura química. 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 dos fármacos.

Foram desenvolvidos numerosos sistemas destinados a estudos *in vitro* de modo a ultrapassar as dificuldades e a complexidade dos ensaios realizados com membranas biológicas. Dos modelos desenvolvidos, os lipossomas mostraram ser uma das estruturas mais adequadas e que melhor mimetizam a interacção dos fármacos com as membranas e a cinética de transferência destes entre duas fases imiscíveis (Pinto-Alphandary, H., *et al.*, 2000), possibilitando o estudo da distribuição dos fármacos pelo organismo através das bicamadas fosfolipídicas.

Como foi mencionado anteriormente, para além de funcionarem como modelos membranares, os lipossomas têm sido também utilizados como vectores de fármacos, promovendo a sua libertação controlada, direccionada para o local de acção e resolvendo problemas inerentes à toxicidade, à necessidade de quimioterapia intracelular e à resistência por parte dos microrganismos. Assim, a utilização de sistemas lipossómicos como vectores de fármacos constitui um avanço promissor no que respeita à modificação das formulações farmacêuticas com vista a melhorar a quimioterapia (Deol, P., *et al.*, 1997), pois apesar de ser uma área recente, os estudos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado a superioridade terapêutica das formulações lipossómicas relativamente à administração dos fármacos livres, sendo alvo de grande interesse por parte da indústria farmacêutica (Sharma, A. e Sharma, U.S., 1997).

Seja qual for o fármaco sujeito a encapsulação, ou a via de administração utilizada, um requisito fundamental para o desenvolvimento de uma formulação com lipossomas é uma elevada taxa de encapsulação do fármaco a ser veiculado, quer este se associe com a membrana lipídica, quer seja aprisionado no compartimento aquoso interno, pois uma encapsulação elevada diminui o custo das formulações e os riscos de toxicidade associada aos lipossomas.

Facilmente se compreende que a determinação do grau de encapsulação é um parâmetro extremamente importante. Quando o fármaco possui características de solubilidade tais que se dissolve na membrana lipídica, esse grau de encapsulação pode ser efectivamente expresso por um coeficiente de partição entre duas fases distintas, a fase aquosa e a fase lipídica.

Neste capítulo serão abordados os fármacos estudados. Embora apresentando actividades terapêuticas muito distintas, a sua escolha foi efectuada na tentativa de obter informações gerais sobre a sua interacção com as vesículas lipossómicas, de modo a possibilitar a compreensão do seu mecanismo de acção *in vivo* e das características fundamentais a nível molecular para a obtenção de formulações lipossómicas mais eficazes.

1 Agentes antituberculosos

A tuberculose e a lepra são as principais micobacterioses que afectam a Humanidade e constituem ainda hoje, apesar dos notáveis progressos realizados na quimioterapia, doenças altamente incapacitantes e socialmente estigmatizantes. Se, de um ponto de vista puramente terapêutico, podemos considerar que mais de 95% dos casos são curáveis, o que tornaria possível a sua erradicação, a verdade é que os condicionalismos higiénicos, dietéticos, sociais e económicos não permitiram, até hoje, alcançar esse objectivo, mormente nos países menos desenvolvidos. Por ano são ainda diagnosticados cerca de 8 milhões de casos de tuberculose que culminam em aproximadamente 3 milhões de mortes (Bermudez, L.E., 1994). Entre nós, como em todo o mundo, a introdução de novas terapêuticas determinou uma diminuição da taxa de mortalidade, mantendo-se, contudo, uma morbilidade ainda apreciável.

A incidência da tuberculose aumentou significativamente na última década devido ao aumento dramático dos casos de SIDA e ao flagelo da toxicodependência, tornando-se novamente num problema de saúde pública, com o aparecimento de diversas estirpes resistentes aos tratamentos convencionais (Deol, P., *et al.*, 1997). Os diversos problemas clínicos hoje existentes estão associados à redução da eficácia da quimioterapia, atribuída à degradação dos fármacos antes de atingirem o seu alvo de acção, ao aumento da concentração inibitória mínima (CIM) ou a resistências primárias. Outras razões apontadas para o insucesso da quimioterapia consistem na dificuldade em atingir as concentrações adequadas de fármaco nos locais de infecção, penetração inadequada nos macrófagos, onde os microrganismos sobrevivem intracelularmente, bem como baixos níveis de estabilidade nas células (Anglada, R.R., 1997).

Um dos factores a considerar na terapia anti-micobacteriana consiste ainda na necessidade dos fármacos serem activos não só relativamente a bactérias extracelulares, como de atingir concentrações inibitórias no interior das células infectadas, mantendo a sua

actividade mesmo no que respeita a bactérias latentes (Deol, P., *et al.*, 1997). Para tal, é necessária a sua penetração no interior das células, o que nem sempre se consegue devido à dificuldade dos fármacos atravessarem a estrutura membranar.

O problema da resistência do bacilo de Koch aos fármacos apresenta características especiais, de interesse fulcral para a terapêutica e, por outro lado, como o tratamento da tuberculose é de longa duração, a toxicidade dos fármacos a utilizar adquire uma relevância excepcional. Dado que estes fármacos não se usam isoladamente, torna-se necessário atender ainda à possível adição de efeitos tóxicos, se dois ou mais fármacos que se usam em associação apresentarem o mesmo tipo de toxicidade (por exemplo, hepatotoxicidade). Por outro lado, a toxicidade destes medicamentos pode adquirir importância especial quando os doentes apresentam patologia concomitante, que os torna mais sensíveis à agressão tóxica de determinado agente antituberculoso (Garrett, J. e Osswald, W., 1987).

A quimioterapia da tuberculose inclui a isoniazida, a rifampicina, a estreptomicina, a pirazinamida e algumas fluoroquinolonas, tais como a ofloxacina e ciprofloxacina, administradas em combinações de dois ou três fármacos. Atendendo a que nos últimos anos as tentativas de síntese de novos fármacos se mostraram infrutíferas, têm vindo a ser desenvolvidas várias alternativas de modo a melhorar os índices terapêuticos dos já existentes.

Em seguida, descrevem-se detalhadamente as características da isoniazida e da rifampicina, que constituem os dois agentes antituberculosos estudados, por serem fármacos de primeira linha.

Isoniazida. A partir do conhecimento da acção antituberculosa da nicotinamida ou vitamina PP prepararam-se outros compostos derivados do ácido isonicotínico no intuito de encontrar antituberculosos mais potentes e eficazes. Para obter esses compostos foi necessário recorrer a um intermediário da síntese química, a hidrazida do ácido isonicotínico. Ao fazer-se o estudo rápido dos intermediários usados no processo de síntese,

verificou-se que a isoniazida era muito activa relativamente ao *Mycobacterium tuberculosis.* Desta forma, a descoberta da eficácia antituberculosa da isoniazida não se pode considerar como fortuita, graças à meticulosa metodologia adoptada pelos investigadores. Embora a síntese química do composto tenha sido realizada em 1912, só em 1952, depois dos estudos já referidos, é que foi introduzida na terapêutica (Garrett, J. e Osswald, W., 1987).

A isoniazida (hidrazida do ácido 4-piridinocarboxílico) é um pó cristalino branco, inodoro e hidrossolúvel, de estrutura química simples: é a hidrazida do ácido isonicotínico e a sua fórmula de estrutura está representada na Figura 2.1. Vários estudos demonstraram que modificações introduzidas na sua estrutura conduziram a derivados menos potentes ou inactivos (Korolkovas, A. e Burckhalter, J.H., 1988).

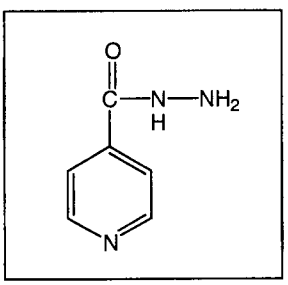


Figura 2.1 Fórmula de estrutura da isoniazida.

In vitro, a isoniazida tem uma acção tuberculostática em concentrações muito baixas (0,025 a 0,05 μg/ml) apresentando, em concentrações um pouco mais altas, um efeito tuberculicida. Verificou-se que a acção da isoniazida é independente do pH do meio e que apenas ocorre quando os bacilos se encontram em fase de multiplicação, pois as bactérias quiescentes são insensíveis ao fármaco.

Quanto ao mecanismo de acção, a isoniazida apresenta efeitos ao nível dos lípidos, da glicólise, da síntese dos ácidos nucleicos, com alterações no teor total do ácido ribonucleico (ARN)[¶] da célula bacteriana por diminuição ou interrupção da sua síntese, e inibição da síntese

¶ As abreviaturas de ARN e ADN são utilizadas para a denominação dos ácidos nucleicos, embora actualmente RNA e DNA tenham adquirido um carácter universal.

do ácido micólico, traduzida na perda da ácido-resistência da cápsula destes bacilos (Mandell, G.L. e Sande, M.A., 1989), (Goodman Gilman, A. *et al.*, 1990) (ver Figura 2.2).

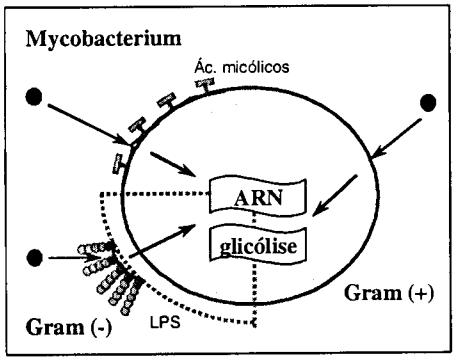


Figura 2.2 Representação do mecanismo de acção da isoniazida.

Passados mais de 40 anos sobre a sua introdução na terapêutica, a isoniazida continua a ocupar um dos primeiros lugares entre todos os agentes antituberculosos conhecidos. Por outro lado, é altamente específica, pois só actua sobre o *M. tuberculosis* e o *M. leprae murium*.

Aliada à sua extraordinária actividade antituberculosa, verifica-se a incidência de efeitos adversos em cerca de 5,4 % dos pacientes tratados com isoniazida (Garrett, J. e Osswald, W., 1987). Podem observar-se fenómenos dispépticos (náuseas, vómitos e diarreia), sobretudo com doses altas, bem como reacções de sensibilidade alérgica que se manifestam habitualmente sob a forma de erupções cutâneas e febre. O aspecto mais relevante da toxicidade da isoniazida é a neurotoxicidade, podendo provocar perda de memória, insónias, inquietação motora e sintomas atropínicos. Outro aspecto da toxicologia da isoniazida é a sua hepatotoxicidade com elevação das transaminases plasmáticas (Korolkovas, A. e Burckhalter, J.H., 1988), (Mandell, G.L. e Sande, M.A., 1989).

Quando utilizada isoladamente, a isoniazida provoca o aparecimento rápido de estirpes resistentes por um mecanismo de selecção, sendo por isso usada na terapia em combinação com outros agentes quimioterápicos, nomeadamente a rifampicina (Korolkovas, A. e Burckhalter, J.H., 1988), (Mandell, G.L. e Sande, M.A., 1989).

Rifampicina. A rifampicina é um derivado semi-sintético da rifamicina B, membro da família das rifamicinas, produzidas pelo fungo *Streptomyces mediterranei*. A rifampicina (21-acetato de 5,6,9,17,19,21-hexaidroxi-23-metoxi-2,4,12,16,18,20,22-heptametil-8-[N-(4-metil-1-piperazinil)formimidoil]-2,7-(epoxipentadeca-[1,11,13]trienimino)naftol[2,1-b]furan-1,11(2H)-diona), cuja estrutura está representada na Figura 2.3, é uma substância de peso molecular elevado, de coloração avermelhada e que é solúvel em solventes orgânicos e em água (Mandell, G.L. e Sande, M.A., 1989).

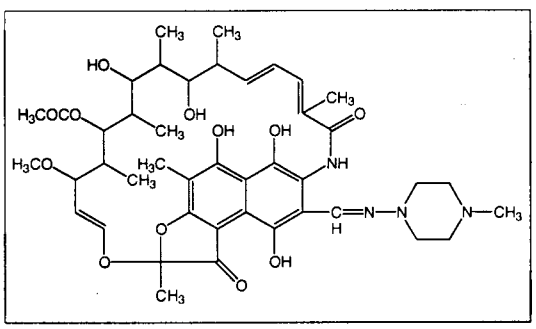


Figura 2.3 Fórmula de estrutura da rifampicina.

Exerce o seu efeito antibacteriano por inibição da polimerase do ARN dependente do ADN, mais especificamente, por inibição da sua subunidade beta, impedindo a síntese do ARN. As concentrações atingidas resultantes da administração de doses terapêuticas não conduzem ao bloqueio da síntese do ácido ribonucleico nas células eucariotas (Figura 2.4).

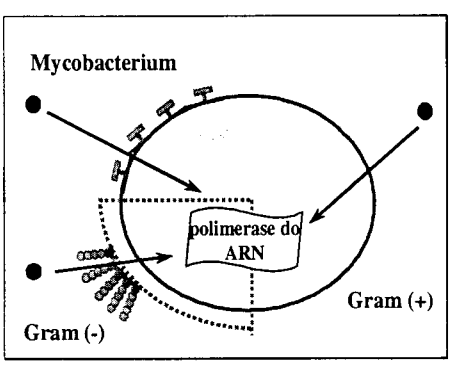


Figura 2.4 Representação do mecanismo de acção da rifampicina.

Do seu espectro de acção fazem parte numerosos agentes de gram-negativo, gram (-), e de gram-positivo, gram (+), sendo de salientar a sua elevada capacidade inibitória em relação aos estafilococos, meningococos, gonococos, *Legionella* e *Clostridium difficile*. De referir que a rifampicina tem ainda actividade antivírica e contra o agente do tracoma (*Chlamydia trachomatis*) (Garrett, J. e Osswald, W., 1987).

A toxicologia da rifampicina é variada, embora só raras vezes seja grave. As reacções de sensibilização alérgica são pouco frequentes, o choque anafiláctico, embora excepcional, já foi observado, bem como algumas alterações hematológicas (Mandell, G.L. e Sande, M.A., 1989) e reacções de intolerância gastrointestinal (náuseas, enfartamento). A potencial capacidade hepatóxica da rifampicina põe um problema que apresenta características semelhantes às descritas para a isoniazida, representando uma sobrecarga apreciável para uma função hepática já comprometida, pelo que está contra-indicada na insuficiência hepática manifesta. Também têm sido descritos alguns casos de insuficiência renal aguda e vários outros aspectos toxicológicos, que se atribuíram à terapêutica intermitente e à formação de anticorpos da rifampicina, o que não foi confirmado.

Praticamente todas as bactérias são capazes de desenvolver resistência à rifampicina, *in vitro* e *in vivo*, provavelmente por mutação, que resulta numa modificação da polimerase. A frequência do aparecimento de mutantes resistentes é relativamente elevada na maior parte das bactérias sensíveis (10^{-7} a 10^{-6}), mas felizmente é menor para o bacilo de Koch (10^{-10} a 10^{-11}). Em todo o caso, se for usada em monoterapia no tratamento da tuberculose (o que é inteiramente desaconselhável), pode surgir resistência em apreciável número de doentes ao fim de um a três meses (Mandell, G.L. e Sande, M.A., 1989).

Importância da utilização dos lipossomas

Face aos problemas inerentes à toxicidade e resistência a estes agentes quimioterápicos, a utilização dos lipossomas por muitos investigadores como veículos de fármacos, tem constituído uma das formas mais efectivas da quimioterapia actual contra infecções por

micobactérias, dado que os lipossomas são captados avidamente pelos macrófagos, que os conduzem aos órgãos do sistema reticuloendotelial e aos locais onde reside a infecção, libertando o seu conteúdo directamente no espaço intracelular (Deol, P., *et al.*, 1997).

A encapsulação dos fármacos em lipossomas permite a sua protecção do ataque enzimático e o reconhecimento imunológico até atingirem as células alvo. Também a toxicidade intrínseca dos fármacos pode ser reduzida e a sua incorporação celular facilitada, aspectos que fazem dos lipossomas sistemas ideais para a terapia de doenças causadas por microrganismos intracelulares (Bermudez, L.E., 1994). As preparações lipossómicas permitem igualmente a libertação dos fármacos encapsulados de um modo mais ou menos lento, mantendo uma determinada concentração sanguínea por longos períodos de tempo.

Desde a década de 80 que se podem encontrar na literatura diversos estudos relacionados com a utilização de suspensões lipossómicas contendo agentes antituberculosos. Em 1983 foram executados ensaios referentes à preparação, eficácia de encapsulação e estabilidade de diversas preparações lipossómicas contendo rifampicina (Tsyganenko, A.I., *et al.*, 1983). Em 1986 alguns autores (Orozco, L.C., *et al.*, 1986) utilizaram lipossomas contendo isoniazida e rifampicina para o tratamento de ratos padecendo de uma forma grave de tuberculose e verificaram que o grupo de ratos tratados com os fármacos encapsulados apresentou uma maior percentagem de sobrevivência após 30 dias, um menor número de unidades formadoras de colónias (UFC), inflamação histológica dos pulmões com menor gravidade e uma melhor resposta ao tratamento, comparativamente aos animais tratados com os fármacos livres. Em 1993 foi estudada a distribuição do fármaco clofazimina, um potente agente antimicobacteriano, no organismo de um grupo de ratinhos, após encapsulação em diversos sistemas lipossómicos, bem como os efeitos laterais e a acumulação renal (Sritharan, M., 1993).

A utilização de lipossomas para o tratamento de infecções por micobactérias resistentes à isoniazida e rifampicina foi também estudada em 1994 (Bermudez, L.E. 1994),

tendo-se procedido à encapsulação de uma quinolona, a ciprofloxacina. Concluiu-se que as preparações lipossómicas permitiram a libertação de doses superiores do fármaco no espaço intracelular, de modo a atingir concentrações inibitórias ou bactericidas, um menor desenvolvimento de resistências e menores efeitos tóxicos e colaterais.

Mais recentemente destacam-se os estudos *in vivo* (Deol, P., *et al.*, 1997), (Quenelle, D.C., *et al.*, 1999) também relacionados com as eficácias terapêuticas de formulações lipossómicas de rifampicina e isoniazida, relativamente a infecções induzidas em ratos pelo *Mycobacterium tuberculosis*. Ambos permitiram demonstrar a enorme vantagem terapêutica da utilização destes sistemas, relacionada com uma maior eficácia farmacológica, um menor desenvolvimento de resistências e uma menor toxicidade.

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 estes fármacos e as vesículas lipossómicas, bem como estudos referentes à sua localização membranar, tópicos que constituem o tema deste trabalho de investigação.

2 Fluoroquinolonas

As fluoroquinolonas constituem armas terapêuticas importantes no combate a diversos microrganismos patogénicos. A actividade bactericida de largo espectro, a boa biodisponibilidade após administração oral, a excelente difusão tecidular e um perfil de segurança favorável, são características que tornam as fluoroquinolonas fármacos excelentes para o tratamento de infecções, quer adquiridas na comunidade como nosocomiais.

O ácido nalidíxico, ácido 1-etil-7-metil-1,8-naftiridina-4-ona-3-carboxílico, descrito nos anos sessenta por Lesher e seus colaboradores, foi o primeiro de uma série de derivados das 1,8-naftiridinas, também chamadas 4-quinolonas (Garrett, J. e Osswald, W., 1987). Possui actividade contra bactérias de gram (-), mas uma acção limitada relativamente a bactérias de

gram (+) e é inactivo contra a *Pseudomonas aeruginosa*. É usado sobretudo no tratamento de infecções urinárias, embora a sua eficácia tenha vindo a diminuir no que respeita a infecções complicadas, devido ao facto de promover a selecção de bactérias resistentes. A administração oral de ácido nalidíxico não produz, no entanto, concentrações intracelulares adequadas ao tratamento de infecções sistémicas, uma vez que apresenta 90% de ligação às proteínas plasmáticas e revela fraca estabilidade tecidular. Quando administrado intravenosamente, nas doses necessárias ao tratamento de infecções sistémicas, revela toxicidade cardíaca e dosistema nervoso central (Garrett, J. e Osswald, W., 1987).

Foi durante a década de 70 que surgiram as fluoroquinolonas de primeira geração por passagem do grupo naftiridona a quinolona, introdução de um grupo piperazina na posição 7 e de um átomo de flúor no núcleo base das quinolonas (ver Figura 2.5).

São exemplos de fluoroquinolonas de primeira geração a norfloxacina, a ofloxacina, a ciprofloxacina, a pefloxacina, entre outras. Estas fluoroquinolonas incluem no seu espectro de acção bacilos de gram (-), como *Pseudomonas aeruginosa* e *Haemophylus,* cocos de gram (-) tais como *Neiseria gonorrhoeae* e *Moraxella catarrhalis* e bactérias de gram (+), como *Staphylococcus aureus e Staphylococcus epidermidis* (Murray, P.R., *et al.*, 1998), (Anglada, R.R., 1997).

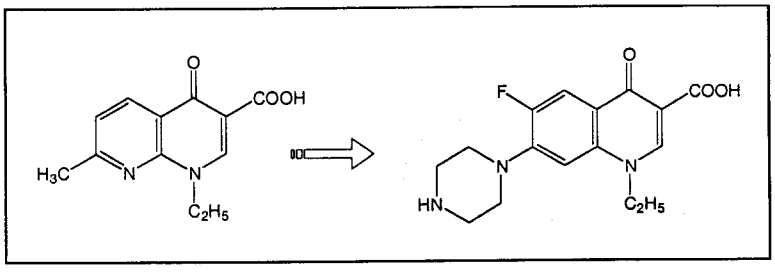


Figura 2.5 Relação entre a estrutura do ácido nalidíxico e da norfloxacina.

As fluoroquinolonas de segunda geração surgiram nos anos 80 e caracterizam-se por um espectro de acção mais alargado no que diz respeito a bactérias de gram (+),

conseguido após introdução de um grupo metilo na posição 5 do anel piperazínico, que aumenta também o tempo de semi-vida dos fármacos (10 -12 h), por introdução de um grupo metilo na posição 5 ou de um halogénio (Cl ou F) ou grupo metoxilo na posição 8, ou ainda pela introdução de um grupo pirimidina na posição 7. Caracterizam-se também pela presença de um grupo volumoso na posição 1, tal como o grupo ciclopropilo já existente na ciprofloxacina, que aumenta a sua potência, com diminuição da concentração inibitória mínima (Wiedemann, B. e Heisig, P., 1997). Desta geração fazem parte a temafloxacina, a sparfloxacina, a grepafloxacina e a gatifloxacina. Na Figura 2.6 encontra-se representada a grepafloxacina.

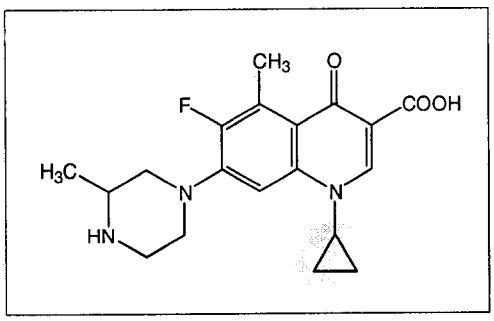


Figura 2.6 Fórmula de estrutura da grepafloxacina.

Finalmente, a partir de 1990 surgiram as fluoroquinolonas de terceira geração, tais como a clinafloxacina, a trovafloxacina, a moxifloxacina e a gemifloxacina. Caracterizam-se por uma actividade aumentada relativamente a microrganismos anaeróbios, que lhes é conferida pela introdução de um grupo metoxilo na posição 8 juntamente com um grupo volumoso na posição 1, tendo algumas destas fluoroquinolonas um núcleo base derivado da naftiridona, tal como a gemifloxacina.

Em termos estruturais, todas as fluoroquinolonas possuem, como já foi referido, um grupo ácido carboxílico e um grupo carbonilo, que se pensa ser essencial para a actividade anti-microbiana e local de quelatação com inúmeros catiões (as quinolonas são potentes

inibidores de algumas enzimas dependentes de iões metálicos). Informações acerca da ionização dos grupos característicos destes fármacos podem ser úteis para uma avaliação das suas propriedades fisico-químicas e da sua actividade biológica (Drakopoulos, A.I. e Ioannou, P.C., 1997). As fluoroquinolonas têm, então, dois grupos funcionais ionizáveis: o grupo carboxílico na posição 3 e o grupo piperazinilo na posição 4´, o que significa que a sua química ácido-base envolve dois protões. Têm também um comportamento hidrofóbico, como o revela o coeficiente de partição num sistema água/*n*-octanol (Montero, M.T., *et al.*, 1994), coeficiente esse dependente da estrutura molecular do fármaco e do pH da solução aquosa.

As fluoroquinolonas apresentam uma excelente biodisponibilidade oral e tempos de semi-vida relativamente longos. Encontram-se em concentrações elevadas na urina, rins, tecido prostático e fezes, embora a sua eliminação se processe essencialmente por via renal. São fármacos de primeira escolha no tratamento de infecções urinárias complicadas, infecções prostáticas, infecções genitais por gonococus, infecções gastro-intestinais (gastroenterite bacteriana), algumas infecções respiratórias e infecções osteo-articulares causadas por microrganismos de gram (-).

As quinolonas actuam por inibição selectiva e reversível da síntese e replicação do ácido desoxirribonucleico (ADN), por bloqueio de uma transição estrutural da enzima girase do ADN e por inibição da topoisomerase IV (Anglada, R.R., 1997), (ver Figura 2.7). A girase do ADN é necessária para a replicação, transcrição de certos operões e intervém nalguns mecanismos de reparação e recombinação do ADN, que é constituído por uma estrutura dinâmica que pode ser dobrada, enrolada e torcida, adoptando diferentes formas helicoidais. Embora a dupla hélice de Watson e Crick seja representada como uma molécula linear, *in vivo* a molécula de ADN tem normalmente uma estrutura fechada circular, podendo o eixo da dupla hélice estar enrolado. O superenrolamento é biologicamente importante, dado que facilita o empacotamento do ADN nas células, influencia o grau de desenrolamento da dupla

hélice, afectando interacções com outras moléculas (algumas enzimas) e activa de forma diferencial alguns promotores da replicação, por facilitar a ligação da polimerase do ARN.

Nas bactérias, o grau de enrolamento resulta de um balanço das acções de superenrolamento e relaxamento levadas a cabo por enzimas diferentes: a girase do ADN, que induz superenrolamento negativo, e a topoisomerase IV, que o remove.

Continuam, no entanto, a existir falhas relativamente ao conhecimento dos mecanismos através dos quais as quinolonas exercem a sua potente actividade bactericida. Os danos no ADN induzidos pelas quinolonas (mediados pela girase do ADN) são importantes, mas o acontecimento letal crítico e o envolvimento de outras macromoléculas permanece inexplicado.

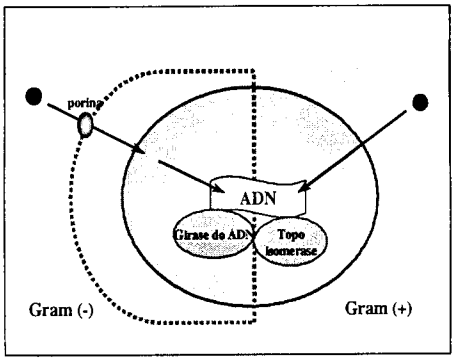


Figura 2.7 Representação do mecanismo de acção das fluoroquinolonas.

O acesso das quinolonas ao seu alvo de acção é determinante para o desenrolar da actividade antibacteriana, pois a membrana externa das bactérias gram-negativo constitui a principal barreira à permeabilidade celular. Pensa-se que são as porinas OmpF e OmpC, existentes na membrana externa das bactérias, as principais zonas de entrada destes fármacos visto que, mutações afectando as porinas aumentam a resistência bacteriana às quinolonas (Aoyanna, H., *et al.*, 1987). A difusão através dos canais porínicos hidrofílicos depende das características hidrofóbicas do composto, sendo tanto maior quanto menor a hidrofobicidade do mesmo. Contudo, o aumento da concentração inibitória mínima (CIM) do

mutante deficiente em porinas, relativamente à estirpe nativa, raramente é superior a quatro vezes o valor da CIM da estirpe nativa. Foi sugerida então uma outra via de penetração não porínica adicional, após verificação da redução da CIM de quinolonas em mutantes rugosos (deficientes em lipopolissacarídeo) de *Salmonella typhimurium* e pelo aumento ligeiro da CIM em mutantes de *Escherichia coli* deficientes em porinas (Ferreira, H.M.N., 1991).

A membrana externa das bactérias de gram (-) é constituída por lipopolissacarídeos cujos grupos polifosfato adjacentes estão complexados por iões magnésio, reduzindo o acesso à bicamada fosfolipídica. O núcleo das quinolonas apresenta dois carbonilos adjacentes nas posições 2 e 3, que formam um local potencial de quelatação de catiões divalentes. As quinolonas interactuam então com a membrana como agentes quelantes, provocando uma deslocação do magnésio ligado, expondo domínios hidrofóbicos da membrana externa, através dos quais penetram na célula (Bedard, J. e Bryan, L.E., 1989). Em células tratadas com quinolonas verifica-se, portanto, um aumento da permeabilidade membranar, sensibilização à lise por concentrações baixas de detergentes e libertação da endotoxina. Neste caso, o passo inicial do processo de difusão celular é então a interacção lípido-quinolona (Montero, M.T., *et al.*, 1998).

Os efeitos secundários e a toxicidade das quinolonas, em doses apropriadas e por tempos limitados, parecem ter pouco significado clínico sendo de referir, como acções secundárias mais frequentes, perturbações gastro-intestinais, reacções cutâneas, cristalúria em caso de utilização de doses elevadas, toxicidade do SNC e toxicidade das cartilagens. Podem ainda apresentar efeitos biológicos hepáticos (aumento das transaminases) e hematológicos (leucopenia e eosinofilia). Relativamente à toxicidade fetal, a norfloxacina causou a perda de embriões em macacos, possivelmente pela supressão de progesterona placentar, razão que, associada à toxicidade para as cartilagens de crescimento, desaconselha o seu uso durante a gravidez (Ferreira, H.M.N., 1991).

Quanto aos mecanismos de resistência às novas quinolonas têm sido descritos três tipos principais (Murray, P.R., *et al.*, 1998):

- Alterações nas enzimas alvo;
- Alterações na membrana externa levando à diminuição da permeabilidade à droga;
- Incremento da expressão de um sistema de expulsão activa dos fármacos.

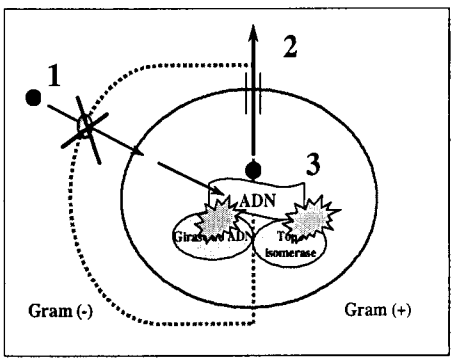


Figura 2.8 Mecanismos de resistência às fluoroquinolonas: 1-alterações na membrana externa das bactérias, nomeadamente ao nível das porinas; 2-expulsão activa dos fármacos; 3-mutações nas enzimas alvo.

O aparecimento de casos de tuberculose provocados por estirpes de *Micobacterium tuberculosis* resistentes à terapêutica convencional, levaram a procurar outras opções terapêuticas e as novas fluoroquinolonas, com espectros de acção alargados, tornaram-se uma alternativa válida para este tipo de tratamentos (Ruiz-Serrano, M.J., *et al.*, 2000).

A actividade invulgar que detêm relativamente a estirpes álcool-ácido resistentes, detentoras de uma superfície celular complexa, parece derivar de algumas propriedades físico-químicas particulares, que não estão relacionadas nem com a sua lipofilicidade nem com a susceptibilidade apresentada pelo seu alvo de acção, a girase do ADN. Contudo, a capacidade das fluoroquinolonas penetrarem no envelope bacteriano poderá explicar a sua actividade antimicrobiana. Assim, o estudo do mecanismo de acção das fluoroquinolonas passa, em parte, pelos domínios da membranologia, particularmente no que se refere à natureza das interacções entre estes fármacos e os fosfolípidos (Vásquez, J.L., *et al.*, 2001).

Importância da utilização dos lipossomas

Estudos com lipossomas referem que a ligação das quinolonas às vesículas lipossómicas é relevante para a compreensão da sua difusão através das bicamadas de fosfolípidos, como um componente da captação pela célula intacta (Bedard, J. e Bryan, L.E., 1989). Propõem ainda que a ligação representa o passo inicial da difusão e que a partilha ocorre depois, particularmente a pH neutro em que a solubilidade aquosa é mínima (Gürsoy, A. e Senyucel, B., 1997). É sobre os processos de interacção das fluoroquinolonas com diferentes fosfolípidos e respectiva localização membranar, que recairam os estudos efectuados durante os trabalhos experimentais realizados, visto que as interacções estabelecidas em ambientes fosfolipídicos não são ainda totalmente conhecidas. Assim, procedeu-se à determinação dos coeficientes de partição de diversas fluoroquinolonas tais como a ofloxacina, a cinoxacina, a norfloxacina e a grepafloxacina, em vesículas lipossómicas de DMPC e DMPG. No entanto, dada a semelhança encontrada relativamente ao comportamento das fluoroquinolonas de primeira geração, optou-se pelo estudo da norfloxacina como fármaco representante deste grupo e da grepafloxacina, como fármaco representante das fluoroquinolonas de segunda geração.

Um outro aspecto igualmente importante das vesículas lipossómicas consiste na sua utilização como vectores, atendendo a que, embora as fluoroquinolonas sofram concentração nas células fagocíticas, existe um rápido efluxo dos macrófagos via carregadores aniónicos orgânicos da membrana (Carrera, I., *et al.*, 1993). A sua incorporação em lipossomas conduz à diminuição do mecanismo de efluxo e ao aumento da retenção intracelular dos fármacos, permitindo o aumento da concentração nas zonas de infecção e reduzindo a sua toxicidade (Pinto-Alphandary, H. e Andremont, A., 2000). Este facto é particularmente importante e justifica, por si só, os estudos efectuados com a grepafloxacina, que foi aprovada na Europa em Julho de 1997 e nos Estados Unidos em Novembro do mesmo ano pela "Food and Drug Administration" (New Antimicrobial Agents approved by the U.S. Food and Drug Administration

in 1997 and New Indications for previously approved Agents, 1998) para o tratamento de infecções respiratórias graves, como: a pneumonia, a tuberculose, exacerbações agudas de bronquite crónica, doenças sexualmente transmitidas, uretrites e cervicites (Hardy, D., et al, 2000), embora tenha sido temporariamente retirada do mercado em 1999 devido ao aparecimento de alguns casos de toxicidade cardiovascular. É importante referir, no entanto, que o seu alargado espectro de acção e a sua eficácia terapêutica, relacionada com a elevada concentração no interior dos macrófagos, sugerem a importância clínica deste fármaco nas infecções por agentes patogénicos intracelulares, tais como *Chlamydia spp.*, *Mycoplasma spp.*, *Micobacterium spp.* e *Legionella spp* e as concentrações elevadas na bílis e vesícula biliar excedem as concentrações inibitórias mínimas de muitos agentes patogénicos (Efthymiopoulos, C., 1997).

3 Agentes antifúngicos

Certos fungos podem provocar infecções (micoses) mais ou menos localizadas na pele, nas mucosas, nas faneras bem como infecções sistémicas variadas. Assim, algumas micoses podem ser acessíveis a tratamentos tópicos, enquanto que outras exigem a administração sistémica de antifúngicos. Os principais antimicóticos usados actualmente são a anfotericina B, os imidazóis, a griseofulvina, a natamicina, o tolnaftato e a nistatina.

A utilização destes compostos tem que ser ponderada tendo em conta a localização, extensão, gravidade e evolução clínica da micose, a potência relativa dos fármacos e a toxicidade de cada um dos antifúngicos (Garrett, J. e Osswald, W., 1987).

No presente trabalho, foi estudado apenas um antifúngico-a griseofulvina (7-cloro-2′,4,6-trimetoxi-6′β-metilspiro[benzofuran-2(3H),-1′-[2]cicloexeno]-3,4′-diona), um pó branco ou branco-amarelado, muito pouco solúvel em água (Korolkovas, A. e Burckhalter, J.H., 1988), que é obtido do *Penicillium griseofulvum* e que estruturalmente é um derivado do benzofurano (Figura 2.9) (Anglada, R.R., 1997).

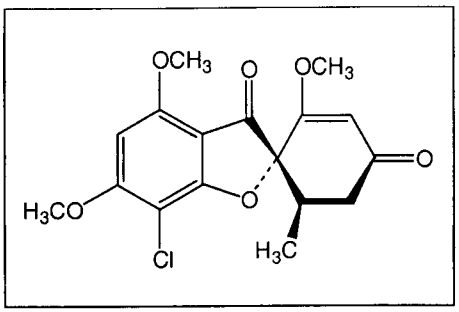


Figura 2.9 Fórmula de estrutura da griseofulvina.

A griseofulvina é administrada por via oral e tem a sua actividade antifúngica limitada aos *Dermatophytes* e ao *Sporotrychum schenchii*; sendo o fármaco de primeira escolha nas infecções pelos referidos fungos. A distribuição pelos diversos tecidos do organismo faz-se com facilidade, sendo importante acentuar que o fármaco atinge a pele, as unhas e os pêlos, acumulando-se na parte mais profunda das estruturas queratinizadas.

Quanto ao modo de acção, a griseofulvina inibe o processo de mitose por interacção com os microtúbulos impedindo a separação dos cromossomas e actua também sobre a replicação do ADN fúngico (Figura 2.10) (Anglada, R.R., 1997), (Murray, P.R., *et al.*, 1998).

A toxicidade da griseofulvina é moderada podendo, no entanto, provocar sede, cefaleias, náuseas e diarreia (Garrett, J. e Osswald, W., 1987); podem também ocorrer reacções de sensibilização alérgica, fotossensibilidde, alterações neurológicas e hepatotoxicidade (Anglada, R.R., 1997).

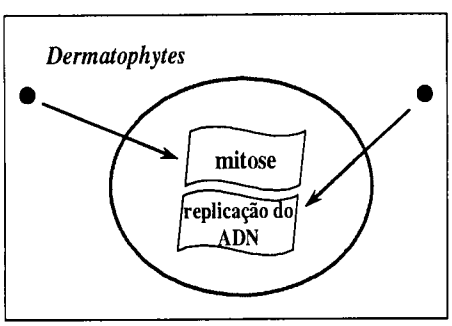


Figura 2.10 Representação do mecanismo de acção da griseofulvina.

Importância da utilização dos lipossomas

Apesar dos progressos alcançados nos últimos anos no tratamento de doenças infecciosas, um dos maiores problemas consiste ainda na falta de conhecimento acerca da especificidade de muitos dos fármacos utilizados, quer devido à sua inacessibilidade relativamente aos locais de acção, quer aos efeitos secundários resultantes da sua administração e instabilidade no meio biológico. Um dos exemplos é a anfotericina B, antifúngico de eleição para o tratamento de infecções sistémicas, cuja acção depende da dose administrada, sendo responsável por graves efeitos adversos que limitam grandemente a sua utilização. Para tentar obviar estes problemas foram propostos uma série de procedimentos, entre os quais a utilização de transportadores tais como as vesículas lipossómicas. Actualmente existem no mercado formulações farmacêuticas de anfotericina B encapsulada em vesículas de DMPC e DMPG que apresentam uma melhor eficácia terapêutica e efeitos tóxicos reduzidos.

Relativamente à griseofulvina, a importância do estudo da interacção com vesículas lipossómicas advém de possíveis vantagens inerentes à sua vectorização, nomeadamente a redução das doses terapêuticas e dos efeitos secundários e o aumento da absorção gastrointestinal, que conduz a concentrações plasmáticas superiores (Sue, M.S., *et al.*, 1993) como também da necessidade de um estudo mais aprofundado acerca da sua interacção com as membranas biológicas, visto ser um fármaco utilizado em infecções fúngicas ao nível da derme mas cuja administração tópica não conduz a qualquer efeito terapêutico, sendo necessário recorrer à sua administração oral.

4 Agentes ansiolíticos: benzodiazepinas

Os agentes ansiolíticos são fármacos usados no tratamento de neuroses e estados de ansiedade, podendo também ser utilizados no tratamento de excitabilidade psicomotora grave. A ansiedade tem sido atribuída a monoaminas cerebrais, a corticosteroides, a nucleótidos, ao ácido γ-amino butírico (GABA), a prostaglandinas e à glicina, sendo a hipótese mais aceite a

de que a ansiedade se deve aos efeitos produzidos por tais substâncias nos sistemas serotoninérgicos no mesencéfalo (Korolkovas, A. e Burckhalter, J.H., 1988).

As benzodiazepinas, usadas inicialmente como miorrelaxantes, foram introduzidas como agentes ansiolíticos a partir de 1964 e são fármacos anticonvulsivantes e miorrelaxantes. Ao clordiazepóxido, primeiro membro desta classe, foram adicionados o diazepam, o oxazepam e o nitrazepam, além de outros fármacos mais recentes.

Os neurónios, embora possuam uma estrutura diferente de acordo com a sua localização no sistema nervoso, têm os mesmos componentes básicos (axónio, membrana dendrítica e corpo celular), rodeados por uma membrana composta por uma camada de lipoproteínas. Devido à diferente permeabilidade da membrana aos vários iões (K^+, Na^+, Ca^{2+}, Cl^-, etc) a composição dos sais no interior e exterior da membrana é diferente, o que faz com que a membrana neuronal, no seu estado de repouso, esteja polarizada, sendo o seu interior mais negativo, o que dá origem ao chamado potencial de repouso.

Quando um estímulo eléctrico atinge um neurónio, a sua actividade eléctrica é alterada gerando um impulso eléctrico, o chamado potencial de acção. A transmissão intraneuronal faz-se apenas por processos eléctricos, mas a transmissão interneuronal é um processo químico que ocorre ao nível das sinapses nervosas.

É através de interacções com os receptores sinápticos que os fármacos que actuam a nível do sistema nervoso promovem a sua acção biológica por alteração do funcionamento de neurotransmissores (Figura 2.11).

Um dos neurotransmissores é o GABA, que parece estar envolvido na regulação de mecanismos cardiovasculares, na regulação de funções endócrinas, na sensação de dor e na ansiedade. Tal como os outros neurotransmissores, encontra-se armazenado nos terminais das células nervosas sendo libertado por um processo que depende da concentração de catião cálcio após despolarização da membrana. A sua actividade parece estar associada a dois mecanismos inibitórios diferentes: a) despolarização pré-sináptica de

um neurónio excitado com diminuição da libertação do neurotransmissor; ou b) hiperpolarização de um neurónio excitado por diminuição do fluxo de anião cloreto, o que torna o neurónio inactivo a um impulso normal. É este segundo mecanismo que parece estar associado à acção das benzodiazepinas (Garrett, J. e Osswald, W., 1987).

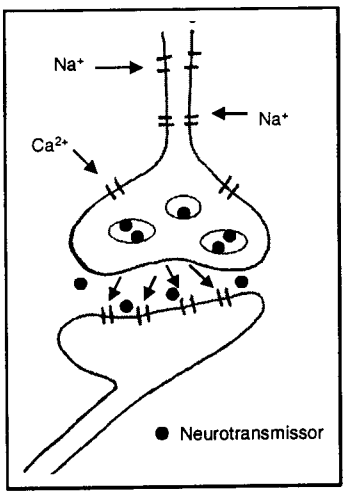


Figura 2.11 Representação esquemática de uma sinapse.

O mecanismo de acção das benzodiazepinas baseia-se então na elevação da actividade das sinapses em que o GABA é o neurotransmissor, por ligação a determinados receptores específicos. Considera-se que o seu mecanismo molecular de acção faz aumentar a frequência de abertura dos canais de ião cloreto que respondem ao GABA, sendo a resposta na presença de benzodiazepinas idêntica à obtida na presença de concentrações mais elevadas do neurotransmissor (Korolkovas, A. e Burckhalter, J.H., 1988).

Tal como acontece para quase todas as séries homólogas, as diferenças entre os diversos tranquilizantes dizem respeito à rapidez de absorção, duração de acção, metabolização e intensidade de efeitos. Os efeitos secundários atribuídos às benzodiazepinas são em geral pouco intensos, consistindo sobretudo em sonolência, cansaço e diminuição do tonos muscular, embora haja também possibilidade de aparecimento de algumas reacções

alérgicas e sanguíneas (anemia hemolítica). Em doses elevadas podem provocar tolerância, habituação e dependência física (Garrett, J. e Osswald, W., 1987).

A benzodiazepina utilizada no presente trabalho foi o clordiazepóxido (7-cloro-N-metil-5-fenil-3H-1,4-benzodiazepina-2-amina-4-oxido) que é um pó cristalino branco ou quase branco, inodoro, fotossensível, higroscópico e pouco hidrossolúvel. É um fármaco com actividade sedativa e hipnótica muito utilizado como tranquilizante e antidepressivo (Neumeyer, J.L.) e a sua fórmula de estrutura encontra-se representada na Figura 2.12.

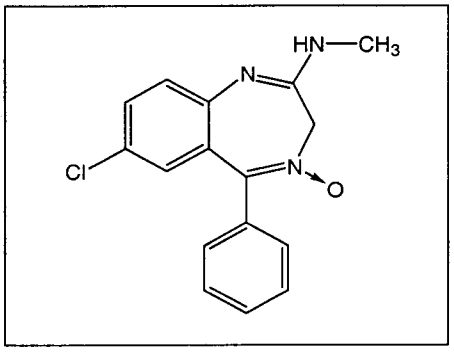


Figura 2.12 Fórmula de estrutura do clordiazepóxido.

As benzodiazepinas, tal como o clordiazepóxido, devido à sua hidrofobicidade, podem sofrer partição relativamente aos domínios lipofílicos das membranas. As interacções envolvendo domínios lipídicos podem conduzir a alterações da dinâmica da delicada organização lipídica através de alterações de fase. Este fenómeno, por seu lado, pode afectar as actividades biológicas através de modificações da conformação que as proteínas integradas nas membranas adoptam em ambientes com diferente fluidez. Também a adsorção de proteínas pode ser afectada devido a alterações no valor e distribuição da densidade de carga à superfície (Garcia, D.A. e Perillo, M.A., 1997).

Importância da utilização dos lipossomas

Dado ser possível que a acção terapêutica do clordiazepóxido esteja associada às suas propriedades de ácido-base e à sua hidrofobicidade, é importante obter informações

sobre o seu comportamento em sistemas heterogéneos que permitam compreender o mecanismo de distribuição deste composto nos diferentes tecidos e fluidos biológicos e, consequentemente, as funções terapêuticas que desempenha.

Sabe-se que as benzodiazepinas 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 (Omran, A.A., *et al.*, 2001), tais como as técnicas que utilizam lipossomas como modelos biomembranares.

Considerações finais

A interacção de muitos fármacos com as membranas lipídicas parece ser importante para explicar o seu modo de acção, não só quando este é mediado por receptores celulares membranares, como no caso da actividade estar inerente à entrada dos fármacos nas células. Deste modo, o mecanismo de acção dos fármacos parece integrar dois passos: o primeiro, envolvendo a partição do fármaco na estrutura lipídica membranar e o segundo, a sua orientação e difusão lateral 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 adequada do fármaco na membrana, pelo que valores de coeficientes de partição elevados aumentam a probabilidade da interacção com os receptores por uma via transmembranar. Neste caso, a orientação com que o fármaco se localiza na membrana também é crucial, uma vez que deverá ajustar-se, na posição adequada, ao centro activo do receptor.

A utilização de um meio heterogéneo, como os lipossomas, estruturalmente semelhantes às membranas lipídicas celulares, veio impulsionar a utilização de novas metodologias vocacionadas para a caracterização físico-química e estrutural do tipo e extensão da interacção de um determinado soluto com as membranas, bem como o discernimento das consequências dessa interacção, quer a nível das propriedades físico-

-químicas do soluto e da vesícula como da caracterização estrutural das interacções, através de técnicas como a ressonância magnética nuclear e a microscopia electrónica. Finalmente, os lipossomas têm sido utilizados com enorme êxito como vectores de fármacos, conduzindo ao melhoramento das suas características farmacocinéticas e à diminuição da sua toxicidade.

Capítulo 3 MÉTODOS EXPERIMENTAIS

1 Coeficientes de partição

Os lipossomas, devido à sua semelhança estrutural com as membranas celulares, têm demonstrado fornecer uma boa correlação relativamente ao transporte de fármacos pelas biomembranas, ao seu comportamento farmacocinético e à actividade biológica de certas classes de compostos, permitindo estudos mais ou menos pormenorizados acerca das interacções fármaco-célula, que têm vindo a adquirir uma importância crescente dada a complexidade estrutural dos sistemas "*in vivo*" (Kubinyi, H., 1995).

A determinação dos coeficientes de partição (K_p) dos fármacos entre as vesículas lipossómicas e o meio aquoso envolvente, constitui um dos aspectos primordiais no que respeita ao estudo das interacções acima e é fundamental para a caracterização da farmacocinética e farmacodinâmica dos fármacos. Como exemplo, pode referir-se o trabalho efectuado por Herbette *et al.*, em que valores de K_p relativamente baixos encontrados para o propanolol foram relacionados com uma duração de acção curta, enquanto que valores de K_p mais elevados, como no caso da amiodarona, foram associados a uma localização mais profunda e relacionados com uma acção mais prolongada (Herbette, L.G. *et al.*, 1988).

Os lipossomas têm vindo a substituir gradualmente os sistemas água/*n*-octanol muito utilizados nestes ensaios de determinação de coeficientes de partição, devido principalmente ao seu arranjo molecular ordenado, semelhante ao das membranas naturais, que varia de um estado de cristal líquido a um estado de gel, mas também pela possibilidade de estudar as influências electrostáticas durante os fenómenos de partição. A incapacidade do *n*-octanol alterar as suas propriedades estruturais e as enormes diferenças existentes relativamente à composição das membranas celulares, ditam a sua cada vez maior inaplicabilidade neste tipo de estudos e a sua substituição progressiva por vesículas lipossómicas.

Os métodos de determinação dos coeficientes de partição lipossoma/fase aquosa podem ser divididos em dois grupos, de acordo com o procedimento de base. No primeiro grupo incluem-se as metodologias que não recorrem à separação de fases, implicando técnicas como as espectroscópicas, calorimétricas, potenciométricas, entre outras, de forma a avaliar a alteração de: a) propriedades do soluto após interacção com o lípido, tais como as suas propriedades espectroscópicas (Neal, S.L. e Villegas, M.M., 1995), potenciométricas (Gücer, N. *et al.*, 1993) ou de acidez (Vásquez, J.L. *et al.*, 1998); b) propriedades do lípido por acção do soluto, como a permeabilidade (Singer, M.A., 1977), a fluidez (Venema, F.R. e Weringa, W.D., 1988), a temperatura de transição de fase (Antunes-Madeira, M.C. e Madeira, V.M.C., 1987); c) ou, finalmente, de uma propriedade de uma terceira molécula que pode ser incorporada no sistema e funcionar como uma sonda. Podem ser usadas sondas de fluorescência (Blatt, E. e Sawyer, W.H., 1985), sondas de ressonância paramagnética electrónica (RPE) (Pinto, L.M.A. *et al.*, 2000), sondas de ressonância magnética nuclear (RMN) (Hauser, H. *et al.*, 1969) etc. A determinação dos coeficientes de partição efectua-se em soluções em que o soluto ligado se encontra em equilíbrio com o soluto livre em solução aproximando-se dos sistemas naturais.

O segundo conjunto é constituído pelos métodos que recorrem a uma separação de fases prévia, envolvendo, por exemplo, processos de filtração, de centrifugação e de diálise, seguidos da determinação quantitativa do soluto numa e noutra fase recorrendo a técnicas habitualmente usadas em análise quantitativa, por exemplo: espectroscópicas e radiométricas. No entanto, muitos destes métodos de obtensão de coeficientes de partição causam, com frequência, perturbações no estado de equilíbrio das amostras (Dipali, S.R. *et al.*, 1996), (Lopes, A.M.G., 1997), alterando os valores de K_p determinados.

Assim, a vantagem clara do primeiro grupo de métodos relaciona-se com o facto de não ocorrer alteração do sistema em estudo, mantendo-se os respectivos equilíbrios químicos estabelecidos entre as moléculas que o constituem. Por outro lado, para além das

técnicas de separação de fases interferirem com os equilíbrios estabelecidos, são geralmente mais morosas e laboriosas. No entanto, os métodos de separação de fases são os mais usuais e óbvios, tendo sido, historicamente, os primeiros a ser usados com o propósito da determinação dos K_p.

Para determinar a quantidade de soluto presente num sistema heterogéneo, pode utgilizar--se uma propriedade espectral qualquer, desde que ocorra variação da propriedade em questão com a polaridade do meio. Deste modo, pode usar-se a espectroscopia de UV--Vis, de infravermelho, de fluorescência, a determinação da anisotropia de fluorescência, os valores dos tempos de vida do estado excitado ou a ressonância magnética nuclear (Chorev, M. *et al.*, 1995), (Sopkova, J. *et al.*, 1994).

Neste capítulo descrevem-se, com algum pormenor, apenas os métodos que foram utilizados neste trabalho para a determinação dos coeficientes de partição dos fármacos em estudo entre uma fase aquosa e vesículas lipossómicas; são, também, apresentados os modelos matemáticos utilizados no cálculo desses coeficientes, bem como os cuidados a ter na utilização de cada técnica, bem como as limitações que lhe estão inerentes.

1.1 Determinação dos coeficientes de partição por espectrofotometria derivativa de UV-Vis

A determinação dos coeficientes de partição de um soluto entre as pseudo-fases lipídica e aquosa por espectrofotometria de UV-Vis baseia-se na variação das suas características espectrais após localização num meio com polaridade diferente, variação essa que pode manifestar-se tanto em alterações da absortividade molar (ε) como no comprimento de onda (λ) (Lopes, A.M.G., 1997).

A utilização da espectrofotometria de UV-Vis para o cálculo dos coeficientes de partição 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 (limite de detecção) permite geralmente o uso de concentrações semelhantes às encontradas nos sistemas naturais.

Se ocorrerem desvios significativos nos valores dos comprimentos de onda entre os espectros do fármaco na fase aquosa e membranar ($\geq$ 5-10 nm) e/ou variações de ε entre os dois solventes ($\geq$10 %), pode quantificar-se o K_p a partir das variações do comprimento de onda ou das variações de ε a um valor fixo do comprimento de onda (Lopes, A.M.G., 1997).

No entanto, a presença de estruturas micro-heterogéneas causa turbidez, o que provoca dispersão de luz, principalmente para comprimentos de onda inferiores a 400 nm, que são traduzidas pelo aumento da absorvância em regiões em que não existem cromóferos a absorver e que resulta da diminuição da quantidade de luz que atinge o detector (Di Giulio, A. *et al.*, 1989). A dispersão de luz é um problema comum em análise espectrofotométrica de amostras farmacêuticas e biológicas e advém da presença de partículas em suspensão que interferem com a luz incidente.

Podem considerar-se dois tipos de dispersão (Owen, A.J., 1998): 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 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 separação das vesículas por centrifugação, filtração por membranas, diálise ou cromatografia em coluna têm sido usada para obter soluções límpidas, mas para além da morosidade inerente, estas metodologias podem, como já foi referido, perturbar o equilíbrio do sistema. Diversos métodos foram desenvolvidos para eliminar a perturbação causada pela dispersão de luz sem recorrer a técnicas de separação, nomeadamente o uso de

referência interna, o método dos três pontos, a modelação da dispersão, a análise multicomponente e a espectrofotometria derivativa, sendo este último um dos mais eficientes e de mais fácil aplicação (Owen, A.J., 1998).

A espectrofotometria derivativa é uma técnica analítica de grande utilidade na análise quantitativa e qualitativa de espectros compostos por bandas sobrepostas ou distorcidas por interferências. Esta técnica possibilita o melhoramento da resolução de 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 ($\lambda_{máx}$). Permite ainda a resolução de bandas sobrepostas, que pode ser conseguida através de métodos computacionais, o desdobramento de espectros compostos e, finalmente, facilita a detecção de picos afectados pela presença de impurezas, diminuindo, ou mesmo anulando, interferências espectrais tais como a dispersão de luz (Talsky, G. *et al.*, 1978), (O'Haver, T.C., 1979), (Gursoy, A. e Senyucel, B., 1997).

A espectroscopia derivativa pode ser usada não só em espectrofotometria de UV-Vis, como também em espectroscopia de infravermelho, de absorção atómica, de emissão de chama e em espectrofluorimetria. É possível a sua aplicação na deconvolução de espectros compostos, permitindo a determinação simultânea de várias espécies. Neste capítulo será abordada apenas a sua aplicação à espectrofotometria de UV-Vis, visto ter sido a técnica utilizada no decorrer do trabalho experimental.

A espectrofotometria derivativa não aumenta o conteúdo de informação dos espectros de ordem zero, mas proporciona uma melhor resolução dos espectros, onde mudanças subtis de curvatura se tornam mais evidentes, facilitando a caracterização de um composto e eliminando a deformação das curvas devido a fenómenos de dispersão de luz e à presença de outras substâncias (Hackmann, E.R.M. et al, 1991).

Existem numerosos exemplos da aplicação desta técnica em química analítica, nomeadamente em análise farmacêutica, análise clínica, análise ambiental e análise

inorgânica (Talsky, G. *et al.*, 1978) e já em 1984 alguns autores aplicaram esta técnica na determinação do K_p da clorpromazina e metaclorpromazina em vesículas fosfolipídicas e em membranas de eritrócitos (Welti, R. *et al.*, 1984) e em 1989, Di Giulio *et al.* usaram a espectrofotometria de 1ª, 2ª e 3ª ordem para eliminar a interferência de lipossomas nos espectros de cefalosporinas (Di Giulio, A. *et al.*, 1989). Outros trabalhos referem a utilização da espectrofotometria derivativa de segunda ordem para a determinação das constantes de dissociação de fenotiazinas em presença do composto não dissolvido, como forma de eliminação da turbidez da solução (Kitamura, K. *et al.*, 1991) e como método de eliminação da interferência espectral causada por β-ciclodextrinas durante a determinação das constantes de ligação da clorpromazina a estas estruturas (Kitamura, K. e Imayoshi, N., 1992). Posteriormente, foi utilizado o mesmo processo para a determinação dos coeficientes de partição em vesículas de lecitina (Kitamura, K. *et al.*, 1995) e para o cálculo dos coeficientes de partição de benzodiazepinas em lipossomas de fosfatidilcolina (Omran, A.A. et al, 2001).

Há, no entanto, que referir que a utilização da espectrofotometria derivativa também apresenta desvantagens, sendo a principal a diminuição sinal/ruído que se torna mais acentuada para derivadas de ordem mais elevada, embora esta diminuição possa ser atenuada com a regularização ("smothing") dos espectros derivados (Rojas, F.S. *et al.*, 1988).

1.1.1 Modelos matemáticos para o cálculo dos coeficientes de partição

O coeficiente de partição molar (K_p) de um fármaco entre uma "pseudo-fase" lipídica, constituída por vesículas lipossómicas, e um meio aquoso é descrito pela equação:

$$K_p = \frac{(C_L/C_T) / [L]}{(C_{Aq}/C_T) / [Aq]} \qquad (3.1)$$

em que C_T é a concentração molar total de fármaco, C_L a concentração molar de fármaco na fase lipídica, C_{Aq} a concentração molar de fármaco na fase aquosa e $[L]$ e $[Aq]$ as concentrações molares de lípido e água, respectivamente.

Nas condições em que é válida a lei de Lambert-Beer, a absorvância (A) de uma solução, contendo uma determinada concentração total de fármaco C_T, que absorve a um determinado valor de λ, que é partilhado entre a fase membranar (L) e a aquosa (Aq), é dada por:

$$A = C_L.\varepsilon_L + C_{Aq}.\varepsilon_{Aq} \qquad (3.2)$$

onde ε_L e ε_{Aq} representam as absortividades molares do fármaco na membrana e em solução aquosa, respectivamente. Se se definir $\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_{Aq}$, a equação anterior pode ser escrita como:

$$A = \varepsilon.C_L + \varepsilon_{Aq}.C_T \qquad (3.3)$$

A diferença entre os valores das absorvâncias dos fármacos na presença e na ausência da fase lipídica pode representar-se por ΔA e é igual a:

$$\Delta A = A - \varepsilon_{Aq}.C_T \qquad (3.4)$$

donde se obtêm as relações $\Delta A = \varepsilon.C_L$ e $\Delta A_{máx} = \varepsilon.C_T$

Atendendo à definição da constante de partição, ΔA pode relacionar-se com K_p segundo a expressão (Kitamura, K. *et al.*, 1995):

$$\Delta A = \frac{K_p \varepsilon\, C_T[L]}{[Aq] + K_p[L]} \qquad (3.5)$$

Tal como as absorvâncias também as intensidades obtidas após derivação dos espectros são proporcionais à concentração de fármaco, desde que os fenómenos de dispersão de luz intrínsecos à presença das vesículas lipossómicas sejam completamente eliminados (Keisuke, K. e Imayoshi, N., 1992).

Representando $d^2Aq/d^2\lambda$ por D e $d^2\varepsilon/d^2\lambda$ por E, ΔD e K_p podem relacionar-se através de uma expressão formalmente idêntica à anterior:

$$\Delta D = \frac{K_p E\, C_T [L]}{[Aq] + K_p [L]} \tag{3.6}$$

O cálculo dos valores de K_p é efectuado pelo ajuste da equação (3.6) aos dados obtidos experimentalmente (ΔD vs [L]) para uma determinada concentração total de fármaco, utilizando um método de regressão não linear. A referida equação pode ser linearizada de acordo com o método dos recíprocos duplos, equação de Benesi-Hildbrand (Connors, K.A., 1987), (Omran, A.A. et al, 2001):

$$\frac{1}{\Delta D} = \frac{1}{\varepsilon\, C_T} + \frac{[Aq]}{K_p \varepsilon\, C_T} \times \frac{1}{[L]} \tag{3.7}$$

A representação gráfica de $1/\Delta D$ em função de $1/[L]$ consiste numa relação linear em que razão entre a ordenada na origem e o declive permite o cálculo de K_p (Wenk, M.R. *et al.*, 1996). A aplicação do método dos recíprocos duplos, embora menos fidedigno, permite validar o modelo anterior por obtenção da relação linear referida. Contudo, a linearização dos dados contém o termo ΔD^{-1} e portanto, pequenos erros aliados aos reduzidos valores de ΔD podem afectar significativamente os resultados.

1.2 Determinação dos coeficientes de partição por espectrofluorimetria

A fluorescência é uma das técnicas mais promissoras nas áreas da química, biologia e medicina neste início do século XXI. As principais razões da sua expansão resultam da elevada sensibilidade e do facto de se tratar de uma técnica não invasiva, permitindo o estudo de amostras *in vivo* e *in vitro* em condições biológicas naturais.

O facto do *modus operandi* ser favorável a uma boa razão sinal/ruído, torna os métodos espectrofluorimétricos nas técnicas de eleição para a quantificação e localização de baixas quantidades de compostos dotados de propriedades fluorescentes em sistemas

micro-heterogéneos pois, na generalidade, são métodos sensíveis a variações de parâmetros tais como a constante dieléctrica, a viscosidade ou a concentração hidrogeniónica do meio.

A fluorescência ocorre sempre que um composto (fluoróforo) contendo duplas ligações conjugadas, geralmente moléculas aromáticas, absorve luz de uma determinada energia, transita para um estado excitado singuleto e ao regressar ao estado fundamental liberta essa energia sob a forma de luz. A excitação electrónica é acompanhada inevitavelmente por um aumento da actividade vibracional e rotacional da molécula (Lacowics, J.R. 1999).

O rendimento quântico de fluorescência (ϕ_f) e o tempo de vida de fluorescência (τ) são as características mais importantes de um fluoróforo. O rendimento quântico é o número de fotões emitidos pelo fluoróforo (Γ) relativamente ao número de fotões absorvidos ($\Gamma+k_{nr}$) e é dado por:

$$\phi_f = \Gamma / (\Gamma+k_{nr}) \qquad (3.8)$$

sendo k_{nr} a fracção de decaimento não-radiactivo de energia durante o regresso ao estado fundamental.

O tempo de vida corresponde ao tempo dispendido pelos fluoróforos no estado excitado antes de regressarem ao estado fundamental e é representado por:

$$\tau = 1 / (\Gamma+k_{nr}) \qquad (3.9)$$

Na ausência de processos não-radiactivos, o tempo de vida dos fluoróforos é denominado intrínseco ou natural e é dado por:

$$\tau_n = 1 / \Gamma \qquad (3.10)$$

O rendimento quântico e o tempo de vida dos fluoróforos podem ser alterados por diversos factores, capazes de afectar cada uma das constantes (Γ ou k_{nr}).

A polaridade dos solventes, bem como o microambiente que rodeia os fluoróforos, podem exercer profundos efeitos nos seus espectros de emissão, observando-se geralmente desvios batocrómicos que são tanto maiores quanto maior for a polaridade do solvente. Por outro lado, o rendimento quântico e o tempo de vida de fluorescência diminuem com o aumento de polaridade do meio (Lacowics, J.R. 1999).

Os fluoróforos quando em solução encontram-se solvatados pelas moléculas de solvente através de atracções dipolares, devidas à presença de dipolos permanentes ou induzidos no soluto e solvente. No estado excitado, os dipolos são geralmente maiores e a sua orientação pode diferir da do estado fundamental. Deste modo, as características das interacções alteram-se imediatamente após a excitação do fluoróforo, iniciando-se um novo rearranjo molecular. Contudo o tempo de permanência no estado excitado é curta e impede as moléculas de atingirem um estado energeticamente favorável. As moléculas dos fluoróforos regressam então ao estado fundamental antes de ocorrer um equilíbrio com as moléculas que as rodeiam e um novo equilíbrio é atingido. Durante estes processos parte da energia é perdida em cada uma das etapas do equilíbrio e assim, quanto maior a interacção entre o fluoróforo e as moléculas que o rodeiam, maior é a perda de energia. Espectroscopicamente, a perda de energia manifesta-se por um deslocamento entre os máximos de absorção e emissão, que é mais acentuado quanto maior a polaridade do solvente. O mesmo se aplica no que diz respeito aos fluoróforos após localização nas diferentes regiões das membranas fosfolipídicas cujas características de polaridade são distintas (Slavik, J., 1994).

Em resumo, da mesma maneira que o espectro de absorção, também o espectro de fluorescência de uma molécula pode ser alterado em função das propriedades do meio. Neste caso, além das modificações causadas pelos processos de absorção, existem vários outros motivos conducentes às modificações espectrais que derivam dos processos emissivos:

a) alterações devidas às diferentes propriedades de solvatação no estado excitado – por modificação da distribuição de carga e/ou geometria (e, portanto, do momento dipolar);
b) modificação da estabilidade energética dos vários estados envolvidos nas transições e consequente alteração das eficiências relativas para os vários processos de desexcitação;
c) acessibilidade diferenciada de possíveis centros de inibição de fluorescência às diversas fases do sistema.

Todas estas possibilidades referentes à alteração das características moleculares intrínsecas tornam mais fácil a determinação do equilíbrio de partição, na medida em que contribuem para a quantificação dos fluoróforos nos diferentes ambientes ocupados. Por outro lado, alguns dos problemas relacionados com a detecção/análise em sistemas média ou fortemente dispersivos, impossíveis de resolver pelas técnicas de espectrofotometria de UV-Vis, são solucionáveis pelos métodos espectrofluorimétricos, visto a emissão de fluorescência ocorrer a maiores comprimentos de onda relativamente aos comprimentos de onda de absorção, dispensando a separação de fases ou a derivação de espectros.

Nas últimas duas décadas tem-se assistido a uma crescente utilização da espectrofluorimetria na determinação dos coeficientes de partição de fármacos em sistemas organizados, tais como as vesículas lipossómicas, podendo referir-se, a título exemplificativo diversos trabalhos como os efectuados por Karczmar e Tritton em 1979 referentes à interacção da adriamicina com vesículas unilamelares pequenas (Karczmar, G.S. e Tritton, T.R., 1979), trabalhos relativos à formação de complexos de inclusão de derivados benzénicos em β-ciclodextrinas (Hoshino, M. *et al.*, 1981) e trabalhos realizados por Mwalupindi em 1994 (Mwalupindi, A.G. *et al.*, 1994). Coutinho, A. e Prieto, M. (Coutinho, A. e Prieto, M., 1995) usaram esta técnica para o estudo da interacção da nistatina com vesículas fosfolipídicas de DPPC e Pedrós (Pedrós, J. *et al.*, 1997) estudaram a interacção da quinina monocatiónica com vesículas fosfolipídicas de DMPC e DMPG.

1.2.1 Modelos matemáticos para o cálculo dos coeficientes de partição

Tal como foi referido anteriormente, o coeficiente de partição molar de um fármaco entre uma fase lipídica e um meio aquoso é dado pela equação (3.1). Se as moléculas de fármaco apresentarem alterações dos seus espectros de emissão de fluorescência em função da polaridade do meio, então os coeficientes de partição podem ser calculados a partir das referidas alterações. O cálculo pode efectuar-se recorrendo ao método de regressão não-linear:

$$\Delta I = \frac{K_p \Delta I_{máx}[L]}{[Aq] + K_p[L]} \tag{3.11}$$

em que os valores de K_p são obtidos após o ajuste da equação (3.11) aos dados experimentais (ΔI vs $[L]$) para uma determinada concentração total de fármaco. A referida equação pode ser também linearizada de acordo com o método dos recíprocos duplos e representada por:

$$\frac{1}{\Delta I} = \frac{1}{\Delta I_{máx}} + \frac{[Aq]}{K_p \Delta I_{máx}} \times \frac{1}{[L]} \tag{3.12}$$

sendo $\Delta I = I - I_0$ a intensidade de fluorescência do fármaco na presença (I) e na ausência (I_0) de lípido e $\Delta I_{máx} = I_\infty - I_0$, o valor máximo desta diferença com I_∞ como valor de I na presença de uma concentração teórica máxima de lípido.

1.3 Determinação dos coeficientes de partição após separação de fases

A determinação dos coeficientes de partição lipossoma/fase aquosa pressupõe a quantificação dos fármacos presentes na fase lipídica e remanescentes na solução aquosa. A concretização convencional deste objectivo engloba a separação das duas fases de forma

à obtenção de uma solução aquosa livre de lipossomas onde a concentração de fármaco pode ser doseada. Procede-se igualmente ao doseamento dos lipossomas antes e após a separação de fases para garantir a isenção total de vesículas na fase aquosa.

Em soluções de sistemas micro-heterogéneos de agregados anfifílicos existem factores que podem invalidar a remoção da fase aquosa nas condições pretendidas. Esses factores podem estar relacionados com os agregados ou serem inerentes a limitações experimentais. Como factores que dizem respeito aos agregados, pode considerar-se a concentração micelar crítica elevada apresentada por alguns agentes anfifílicos, bem como cinéticas rápidas de associação/dissociação, o que impossibilita a remoção completa dos agregados. Por outro lado, muitos agregados são demasiado pequenos para permitir uma separação eficiente com os métodos físicos de separação habituais. Os requisitos experimentais dos métodos de separação disponíveis podem não ser compatíveis com certas condicionantes termodinâmicas da partição no sistema, nomeadamente o tempo requerido para a separação dos agregados pode ser longo, incompatível com cinéticas de partição rápidas. Pelos motivos referidos, a aplicabilidade destes métodos restringe-se a vesículas e membranas biológicas e apenas a solutos que possuam valores de K_p >100, para permitir o uso de pequenas fracções lipídicas (Lopes, A.M.G., 1997).

A separação das duas fases aquosa e lipídica pode fazer-se recorrendo às seguintes metodologias:

1) Centrifugação e ultracentrifugação (Wright, S.E. *et al.*, 1990). São técnicas que permitem a separação de fases através da indução da sedimentação das vesículas lipossómicas por aplicação de uma força centrifuga, com obtenção de um sedimento lipídico e de uma fase aquosa sobrenadante, sendo a velocidade de centrifugação inversamente proporcional à densidade das vesículas lipossómicas a separar.

2) Filtração (simples e coadjuvada pela centrifugação). A filtração simples é um método lento que não é usado com muita frequência. A filtração coadjuvada pela centrifugação permite uma separação mais rápida e o doseamento a partir do conhecimento da concentração do soluto nas fases lipídica e aquosa (Dipali, S.R. *et al.*, 1996).
3) Diálise. Trata-se de um processo de separação parcial, na medida em que grande parte da solução aquosa intravesicular não é fisicamente acessível. Permite a quantificação do coeficiente de partição apenas a partir de dados da concentração do soluto na fase aquosa extravesicular. Tem como principais desvantagens o facto de ser um processo muito moroso e de, quando se trabalha com fármacos com equilíbrios de partição lentos, poder haver sub ou sobrestimação da encapsulação dependendo do tempo de duração da diálise (Miyoshi, H. *et al.*, 1987), (New, R.R.C., 1990).
4) Desorção higroscópica. Este método tem como princípio a utilização de membranas e filtros absorventes como forma de proceder à desorção da solução aquosa da superfície dos lipossomas. Este método tem, no entanto, fornecido resultados pouco conclusivos (Dipali, S.R. *et al.*, 1996).
5) Cromatografia de filtração em gel. Usa geles de Sepharose ou Sephadex, podendo ser efectuada em coluna, usando um eluente. É muito usado para a determinação do valor do coeficiente de partição de fármacos encapsulados em lipossomas unilamelares. Os lipossomas, sendo partículas grandes, passam através do gel e são eluídos em primeiro lugar, sendo posteriormente eluída a solução de fármaco livre (Montero, M. T., 1994). É um método lento e difícil de usar com grandes volumes de suspensão e os lipossomas podem ser recuperados mas estão sujeitos a diluição. A filtração em gel pode também ser usada nos processos de centrifugação em minicoluna, que se baseiam no princípio da adsorção da fase aquosa externa dos lipossomas que contêm o fármaco não encapsulado. As fases separadas são retiradas por centrifugação. A vantagem deste procedimento centra-se no facto de não haver diluição dos lipossomas (New, R.R.C., 1990).

6) Separação por gradiente de densidade de ficoll. O princípio deste método consiste na flutuação dos lipossomas num gradiente descontínuo de densidades. Os lipossomas passam para o topo do gradiente, enquanto que o fármaco não encapsulado permanece no fundo (Dipali, S.R. *et al.*, 1996).
7) Métodos de agregação. Baseiam-se no aumento da densidade dos lipossomas de forma a facilitar a sua deposição por centrifugação, o que pode ser conseguido com protamina ou metais pesados (Dipali, S.R. *et al.*, 1996).
8) Técnicas cromatográficas com membranas imobilizadas. Os lipossomas vão constituir a fase estacionária e o tempo de retenção do soluto vai reflectir a sua afinidade para a membrana (Ong, S. *et al.*, 1995).

Neste trabalho optou-se pela separação de fases por uma técnica de ultra-filtração, ou filtração adjuvada pela centrifugação, pelo que se segue a sua descrição mais pormenorizada.

1.3.1 Filtração adjuvada pela centrifugação

A densidade da fosfatidilcolina da gema de ovo pura, utilizada na preparação de vesículas lipossómicas, é de 1,0135 $g.ml^{-1}$, valor que é aumentado após inclusão de colesterol ou proteínas membranares e que é superior para lípidos saturados (New, R.R.C., 1990), sendo esperada a sua sedimentação sob a influência de um campo gravitacional. No entanto, o coeficiente de sedimentação (s) em água de vesículas unilamelares de fosfatidilcolina de 21 nm de diâmetro foi calculado em 2,6 s, sendo necessário, para depositar estas vesículas, uma centrifugação a 200 000 *g* durante 10-20 horas numa ultracentrífuga preparativa (New, R.R.C., 1990). Verifica-se que quanto menor o tamanho das vesículas maior a velocidade de centrifugação e o tempo dispendido na separação de fases. Assim, as principais desvantagens da centrifugação simples prendem-se com estes dois factores, que conduzem facilmente à ocorrência de interferências nos equilíbrios de partição

dos fármacos entre as fases aquosa e lipídica, podendo ocorrer libertação do fármaco da superfície do lipossoma. Outra desvantagem siginificativa advém da dificuldade em manter constante a temperatura durante a fase de centrifugação, que pode conduzir à transição de fase dos lípidos com passagem de um estado de cristal líquido a um estado de gel. A possibilidade de algumas membranas permanecerem no sobrenadante, bem como a co-sedimentação do soluto sem haver uma verdadeira partição, são fenómenos que podem também conduzir a resultados erróneos.

A centrifugação adjuvada de filtração (ultra-filtração), usando dispositivos contendo membranas de celulose, permite a separação de lipossomas unilamelares de uma forma fácil e rápida, possibilitando o cálculo dos coeficientes de partição e das eficácias de encapsulação dos fármacos. Devido ao seu tamanho, os lipossomas ficam retidos na membrana, facto comprovado pelo seu doseamento na suspensão inicial e na fase lipídica após separação de fases, enquanto a fase aquosa, isenta de lípido, contendo o fármaco não encapsulado passa através do filtro.

As principais desvantagens deste método, para além das referidas para as técnicas de separação de fases, estão relacionadas com a colmatação do filtro para concentrações de lípido elevadas, impedindo a passagem de fármaco livre através da membrana. Assim, a concentração de lípido deve ser controlada, não devendo ultrapassar os 5 mg/ml (cerca de 6 mM) (Dipali, S.R. *et al.*, 1996). Por outro lado, a permanência de alguma água de hidratação em contacto com o lípido separado pode ser uma fonte de erro (Lopes, A.M.G., 1997) e ainda, à medida que a solução aquosa é filtrada, a concentração de lípido na restante solução vai aumentando, podendo ocorrer alterações no equilíbrio de partição.

Este processo de separação de fases por ultra-filtração pode efectuar-se facilmente recorrendo a dispositivos disponíveis no mercado com a denominação comercial de Centricon®, que contêm uma membrana de celulose regenerada, cuja porosidade é inferior ao tamanho das vesículas lipossómicas permitindo a sua retenção e separação.

1.3.2 Modelo matemático para cálculo dos coeficientes de partição

O cálculo dos coeficientes de partição efectua-se, após separação de fases, a partir das concentrações de fármaco determinadas nos filtrados (C_{Aq}) e sedimentos lipídicos (C_L), segundo a equação (3.1):

$$K_p = \frac{(C_L/C_T)\,/\,[L]}{(C_{Aq}/C_T)\,/\,[Aq]}$$

A partir do método de separação de fases pode calcular-se facilmente a eficácia de encapsulação dos fármacos (*E.E.*), que corresponde ao quociente entre as razões fármaco/ lípido final (após separação) e fármaco/lípido inicial (total) e que se encontra representada pela equação:

$$E.E. = \frac{(fármaco/lípido)_{final}}{(fármaco/lípido)_{inicial}} \times 100 \qquad (3.13)$$

sendo as concentrações de fármaco expressas em g/l e as concentrações de lípido em mol/l.

2 Localização dos fármacos nos lipossomas

O estudo da distribuição de espécies monoatómicas e moléculas através das membranas celulares reveste-se de grande importância para o conhecimento dos sistemas biológicos. Os fármacos, de acordo com as suas características hidro-lipofílicas, distribuem-se entre as membranas e a fase aquosa das células segundo um equilíbrio termodinâmico e esta distribuição determina a sua concentração em cada uma das fases e, consequentemente, o grau de interacção com outras moléculas, tais como receptores e enzimas localizadas no citoplasma, ou embebidas na membrana lipídica a diferentes profundidades. O conhecimento da localização membranar dos fármacos permite assim um estudo mais aprofundado do seu modo de acção, contribuindo para o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas mais potentes, selectivas e detentoras de menores efeitos secundários.

A localização membranar dos fármacos pode efectuar-se, fundamentalmente, através de dois tipos de métodos distintos:

1) Métodos directos, em que a localização é avaliada por técnicas como a difracção de neutrões (Herbette, L. *et al.*, 1983), difracção de raios-X (Miller, J.P. *et al.*, 1996), dispersão de raios-X de ângulo rasante (Mason, R.P., *et al.*, 1991), Infra-vermelho associado a transformada de Fourrier (Bañuelos, S. *et al.*, 1993), RMN (Hauser, H., 1969), entre outros.
2) Métodos indirectos, em que uma determinada propriedade é medida e depois relacionada com a localização dos solutos. Essa propriedade pode ser do próprio soluto, como as suas propriedades espectroscópicas (Hasegawa, T. *et al.*, 1996), que podem sofrer alterações relacionadas com os diferentes microambientes da membrana (microviscosidade ou constante dieléctrica), ou propriedades de sondas de localização membranar conhecida (sondas de fluorescência, de RPE, etc.) e cuja alteração diferencial por acção do soluto permite inferir acerca da localização deste na membrana.

Na maioria dos casos, os fármacos interactuam com as membranas posicionando-se em locais bem definidos, sendo a estrutura membranar um factor muito importante no que diz respeito à referida interacção. Deste modo, qualquer alteração na composição das membranas pode reflectir-se na localização dos fármacos e, consequentemente, na sua actividade farmacologica.

Neste capítulo referem-se apenas as técnicas de espectroscopia de fluorescência e de ressonância magnética nuclear, que consistem em métodos indirectos e que foram utilizadas ao longo deste trabalho com vista à determinação da localização membranar dos fármacos em estudo.

2.1 Aplicações da espectroscopia de fluorescência ao estudo da localização membranar dos fármacos

Os estudos efectuados por fluorescência são métodos indirectos de localização membranar dos fármacos e baseiam-se em fenómenos de extinção[¶] de fluorescência e de anisotropia de fluorescência, hoje muito utilizados como fonte de informação acerca de sistemas bioquímicos.

Por processos de extinção de fluorescência designam-se todos os mecanismos baseados em interacções moleculares, que conduzem a uma diminuição da intensidade de fluorescência de uma amostra. Estes mecanismos incluem reacções de estado excitado, rearranjos moleculares, processos de transferência de energia, formação de complexos no estado fundamental e desactivação colisional (Lakowicz, J.R., 1999).

A anisotropia de fluorescência fundamenta-se na determinação do grau de polarização da luz emitida por um fluoróforo, após excitação por um feixe de luz também polarizada. A anisotropia está directamente relacionada com o grau de difusão rotacional do

[¶] O termo extinção constitui a tradução habitualmente utilizada de "quenching".

fluoróforo durante o tempo de vida do estado excitado o qual, por seu lado, depende das características do meio onde está integrado.

2.1.1 Sondas de fluorescência

A fluorescência emitida por um determinado fluoróforo contém informações relacionadas não apenas com o fluoróforo, mas também acerca das moléculas que o rodeiam. Desta forma, o fluoróforo pode ser utilizado como um pequeno "repórter molecular" posicionado num determinado local de interesse e é vulgarmente conhecido como sonda de fluorescência.

As sondas permitem obter uma grande variedade de informações através da análise dos seus espectros de excitação, de emissão, do rendimento quântico de fluorescência, do tempo de vida e da polarização. Sob o ponto de vista molecular, esta informação envolve dados sobre os movimentos rotacionais e translaccionais dos fluoróforos, bem como das moléculas que os rodeiam, a sua dissociação ou agregação, trocas de energia de excitação com outras moléculas e iões, interacções com campos eléctricos, etc. Através do conhecimento adequado dos processos de fluorescência é possível obter informações sobre a fluidez membranar, viscosidade e polaridade dos solventes, distância entre dois cromóforos, potencial de membrana, concentrações iónicas intracelulares, etc (Slavic, J., 1994).

Relativamente à aplicação das sondas de fluorescência a amostras biológicas, há dois aspectos fundamentais a ter em conta: a localização da sonda e o tipo de informação por ela fornecida.

Nos sistemas biológicos é possível considerar geralmente dois tipos de sondas: por um lado, sondas intrínsecas, tais como proteínas e polipeptídeos contendo resíduos de triptofano e tirosina, que são fluoróforos naturais do sistema, por outro, sondas extrínsecas, que são moléculas fluorescentes adicionadas ao sistema.

Para que um composto possa ser usado como sonda de fluorescência extrínseca deve: a) possuir um elevado coeficiente de partição membrana/solução aquosa, de modo a que a sua incorporação na bicamada seja praticamente completa, ou um rendimento quântico na fase aquosa quase nulo; b) ter um valor de rendimento quântico na membrana elevado, para que a relação sinal/ruído seja aceitável; c) possuir bandas de absorção e fluorescência distintas das do sistema membranar em estudo; d) ser sensível à propriedade membranar que se pretende estudar; e) possuir características de forma a não causar alteração da estrutura da membrana ou promover a agregação ou fusão das vesículas; f) deve possuir uma pureza elevada; g) a sonda não deve sofrer fotodegradação ou fotodimerização durante a excitação e; h) é conveniente que as sondas permaneçam ligadas a um componente da membrana, de modo a que a região membranar sobre a qual a sonda nos fornece informações seja conhecida (New, R.R.C., 1990), (Slavic, J., 1994).

Actualmente existe uma vasta gama de compostos utilizados como sondas de fluorescência nos mais diversos estudos, entre os quais podemos referir as moléculas de DPH (1,6-fenil-1,3,5-hexatrieno), TMA-DPH (1-(4-trimetilamóniofenil)-6-fenil-1,3,5-hexatrieno), o pireno, o ANS (ácido 8-anilino-1-naftalenossulfónico), os nitróxidos e as sondas da série *n*-AS (ácido n-antroiloxiesteárico).

2.1.2 Extinção de fluorescência

A extinção de fluorescência tem sido amplamente estudada, não só para a compreensão dos fenómenos que lhe estão associados, mas sobretudo como fonte de informação acerca de sistemas químicos e bioquímicos. As aplicações bioquímicas devem-se às interacções moleculares intrínsecas durante os processos de extinção entre fluoróforo e agente de extinção.

A extinção de fluorescência pode ser dinâmica (colisional) ou estática. No primeiro caso, ocorre difusão do agente de extinção até ao fluoróforo durante o tempo de vida do seu estado excitado e, após o contacto, o fluoróforo regressa ao estado fundamental sem

emissão de um fotão. No segundo caso, ocorre formação de um complexo não fluorescente entre o fluróforo e o agente de extinção no estado fundamental.

Quando a extinção é do tipo dinâmica ou colisional os fluoróforos só são afectados no estado excitado, não se verificando alterações dos espectros de absorção e apenas uma diminuição da intensidade das bandas de excitação. No caso da extinção ser estática há formação de complexos fluoróforo-desactivador no estado fundamental, com alteração dos espectros de absorção (Lakowicz, J.R., 1999).

Em qualquer dos casos tem que ocorrer contacto molecular, facto que justifica as inúmeras aplicações desta técnica, entre as quais a localização membranar de moléculas (Lakowiks, J.R., 1999).

2.1.2.1 Extinção de fluorescência dinâmica ou colisional

O fenómeno de extinção de fluorescência pode ocorrer por interacção colisional entre um fluoróforo e um agente de extinção de fluorescência. Neste caso, a diminuição da fluorescência pode ser relacionada com a concentração do agente de extinção pela equação de Stern-Volmer (Lakowicz, J.R., 1999):

$$F_o/F - 1 = K_D[Q] \leftrightarrows \tau_o/\tau - 1 = k_q \tau_o [Q] \qquad (3.14)$$

onde F_o e F representam a intensidade de fluorescência do fluoróforo na ausência e na presença do agente de extinção, respectivamente. Os símbolos τ_o e τ representam os tempos de vida do fluoróforo no estado excitado, na presença e na ausência do agente de extinção, e k_q é a constante de velocidade do processo de extinção de fluorescência. K_D é a constante de Stern-Volmer para a desactivação dinâmica e que é dada pela expressão $k_q.\tau_o$. A constância da razão entre os valores de F_o/F e τ_o/τ pode ser usada como comprovativo de que a extinção de fluorescência é do tipo dinâmico ou colisional (Lakowicz, J.R., 1999). Um gráfico F_o/F ou τ_o/τ em função da concentração do agente de extinção $[Q]$ origina uma recta com ordenada na origem igual a zero e declive igual a $k_q.\tau_o$. A constante bimolecular de

velocidade de desactivação (k_q) reflecte quer a eficiência do processo, quer a acessibilidade do agente e geralmente tem um valor aproximado de $1x10^{10}$ $M^{-1}s^{-1}$(Lakowicz, J.R., 1999). Valores menores podem ser resultado de uma protecção estática do floróforo, enquanto que valores superiores geralmente reflectem a existência de interacções envolvendo ligações entre o fluoróforo e o agente de extinção (Lakowicz, J.R., 1999).

Ainda dentro do conceito de extinção colisional há a considerar que k_q é igual a $f_Q k_o$, onde f_Q é a constante de eficácia de extinção e k_o a constante bimolecular controlada por difusão. O valor de k_o pode ser calculado pela equação de Smoluchowski:

$$k_o = 0{,}004\pi N (R_f + R_q) (D_f - D_q) \qquad (3.15)$$

sendo R o raio de colisão, D o coeficiente de difusão, N o número de Avogadro e os subscritos f e q relativos ao fluoróforo e ao agente de extinção, respectivamente (Lakowicz, J.R., 1999).

2.1.2.2 Extinção de fluorescência estática

O mecanismo estático de extinção de fluorescência ocorre quando parte da população de fluoróforo é inactivada por formação de um complexo com o agente de extinção no estado fundamental (modelo de formação de complexo).

Neste processo, a extinção de fluorescência é causada pela formação de um complexo não fluorescente entre fluoróforo e desactivador, que quando absorve luz, volta imediatamente ao estado fundamental sem emissão de fotões, fenómeno que pode ser traduzido por uma equação do mesmo tipo da equação da extinção dinâmica, mas em que K_S é a constante de formação do complexo (Lakowicz, J.R., 1999):

$$F_o/F - 1 = K_s [Q] \qquad (3.16)$$

A dependência de F_o/F em função de $[Q]$ continua a ser linear, tal como o observado para a desactivação dinâmica. A distinção entre os dois fenómenos não é obvia, sendo o

método mais seguro a determinação dos tempos de semi-vida do fluoróforo pois, enquanto que para a extinção dinâmica $F_0/F = \tau_0/\tau$, para a estática $\tau_0/\tau = 1$. Essa distinção pode ainda ser conseguida por determinação da constante de extinção (K_S ou K_D) a várias temperaturas, porque o aumento da temperatura faz diminuir a viscosidade do meio e, consequentemente, aumenta a difusão das moléculas, aumentando a constante da extinção dinâmica. O aumento da temperatura faz, por outro lado, diminuir a estabilidade dos complexos, diminuindo a desactivação estática. Ainda outro método de distinção entre os dois tipos de extinção de fluorescência consiste em examinar o espectro de absorção do fluoróforo: a desactivação colisional apenas afecta o seu estado excitado, não sendo de prever alterações no espectro de absorção, contrariamente ao que acontece quando há formação de um complexo, que pode trazer alterações de bandas do espectro de absorção (Lakowicz, J.R., 1999).

Por vezes, a distinção entre os dois mecanismos não é conclusiva nem estritamente necessária, pelo que a constante de Stern-Volmer é representada por K_{SV}, referindo-se a desactivação dinâmica ou estática (Lakowicz, J.R., 1999).

2.1.2.3 Desvios à equação de Stern-Volmer

Os processos de desactivação de fluorescência nem sempre são representados por uma relação linear entre F_0/F e $[Q]$, podendo observar-se desvios quer positivos (contra o eixo das abcissas) quer negativos (a favor do eixo das abcissas), que traduzem fenómenos adicionais ou alternativos de desactivação de fluorescência.

Desvios Positivos. A existência conjunta de processos estáticos e dinâmicos pode ser um factor que dificulta a análise de dados de desactivação de fluorescência. O efeito resultante é a curvatura positiva na função de Stern-Volmer, ou seja, contra o eixo das abcissas. O componente estático pode corresponder ao modelo de formação de um complexo ou ao da esfera de acção.

A combinação do modelo dinâmico com o de formação de um complexo resulta na seguinte equação (Lakowicz, J.R., 1999):

$$F_0/F = 1 + (K_D+K_S)[Q] + K_D.K_S.[Q]^2 \quad (3.17)$$

Outra teoria que descreve este tipo de desvio é a teoria da esfera de acção, que considera que quando a extensão de desactivação dinâmica é muito elevada, pode considerar-se uma esfera de volume V rodeando o fluoróforo, onde a eficácia de desactivação é unitária e, se o agente de extinção estiver suficientemente perto do fluoróforo aquando da sua excitação, a desactivação é imediata e não é regida por processos de difusão. A conjugação do modelo dinâmico com a esfera de acção resulta na equação (Lakowicz, J.R., 1999):

$$F_0/F = (1+K_D[Q])e^{V[Q]} \quad (3.18)$$

que permite o cálculo do valor de K_D.

Desvios negativos. Os desvios negativos à relação de Stern-Volmer podem ser indicativos da presença de múltiplas populações de fluoróforos com diferentes acessibilidades, tal como fluoróforos localizados no folheto externo e interno da bicamada, ou em diferentes estados de protonação (Lakowicz, J.R., 1999). Outros autores atribuem este efeito a uma saturação dos locais de ligação dos agentes de extinção (Sikaris, K.A. e Sawyer, W.H., 1982), (Chalpin, D.B. e Kleinfeld, A.M. (1983). Nestes casos, a função de Stern-Volmer apresenta uma curvatura negativa, ou a favor do eixo das abcissas.

A intensidade total de fluorescência na ausência do agente de extinção de fluorescência (F_0) é dada por:

$$F_0 = F_{0a} + F_{0b} \quad (3.19)$$

Na presença do agente de extinção a intensidade de fluorescência da fracção acessível (f_a) dimuniu de acordo com a equação de Stern-Volmer, enquanto que a fracção

inacessível não sofre extinção de fluorescência. Deste modo, a intensidade observada é dada por:

$$F = \frac{F_{0a}}{1 + K_a[Q]} + F_{0b} \tag{3.20}$$

sendo K_a a constante de Stern-Volmer da fracção acessível e [Q] a concentração do agente de extinção. Da subtracção das equações (3.20) e (3.19) obtém-se:

$$\Delta F = F_0 - F = F_{0a}\left(\frac{K_a[Q]}{1 + K_a[Q]}\right) \tag{3.21}$$

Do inverso da equação (3.21) seguido da divisão pela equação (3.19) obtém-se a seguinte equação:

$$\frac{F_0}{\Delta F} = \frac{1}{f_a K_a[Q]} + \frac{1}{f_a} \tag{3.22}$$

sendo f_a definida por

$$f_a = \frac{F_{0a}}{F_{0b} + F_{0a}} \tag{3.23}$$

Esta alteração da equação de Stern-Volmer permite então a determinação gráfica de K_a e f_a a partir do traçado de $F_0/\Delta F$ versus 1/[Q].

2.1.2.4 Transferência de energia de ressonância (RET)

A estrutura e dinâmica das macromoléculas são factores essenciais para o conhecimento das suas funções e a extinção de fluorescência proporciona a obtenção de informações importantes, sendo de grande interesse na área da bioquímica analítica (Selvin, P.R., 2000). Um mecanismo importante de extinção de fluorescência em sistemas biológicos consiste na transferência de energia de ressonância (RET).

Embora o fenómeno da transferência de energia tivesse sido observado no início do século XX por Perrin, foi Förster quem, no final dos anos 40, propôs um modelo para descrever as interacções moleculares à distância e a ele se deve a equação que relaciona as distâncias com as propriedades espectroscópicas dos cromóforos (Wu, P., Brand, L., 1994).

Os processos de transferência de energia ocorrem sempre que o espectro de emissão de fluorescência de um fluoróforo, designado por dador, se sobrepõe ao espectro de absorção de outra molécula, denominada aceitador, que não necessita de ser fluorescente. É importante salientar que os fenómenos de transferência de energia não envolvem fotões e que o dador e o aceitador se relacionam através de interacções dipolo--dipolo (Lakowics, J.R. 1999).

A eficiência de transferência de energia é determinada pela distância entre dador e aceitador e pela extensão da sobreposição espectral. A sobreposição espectral é descrita em termos de distância de Förster (R_0) e a constante de velocidade de transferência de energia (k_T) é dada pela equação:

$$k_T(r) = \frac{1}{\tau_D}\left(\frac{R_0}{r}\right)^6 \qquad (3.24)$$

sendo r a distância entre o dador e o aceitador e τ_D o tempo de semi-vida do dador na ausência do aceitador.

As distâncias críticas de transferência estão compreendidas entre 15-60 Å, sendo comparáveis à espessura das membranas biológicas. Assim, os fenómenos de transferência de energia de ressonância têm sido utilizados como indicadores de proximidade para estimar a distância entre dador e aceitador, sendo vulgarmente descritos como "régua espectroscópica" e possibilitam inferir acerca da localização membranar de fármacos recorrendo a sondas de fluorescência cuja localização seja perfeitamente conhecida (Cantor & Schimmel, 1980), (Lakowics, J.R., 1999).

A teoria referente à transferência de energia de ressonância é complexa mesmo nos casos mais simples que incluem dadores e aceitadores em posições fixas, logo caracterizadas por uma distância definida. A complexidade aumenta significativamente quando pensamos em sistemas em solução, onde existe uma distribuição aleatória das distâncias entre dador e aceitador e se verifica uma maior transferência de energia entre dadores e aceitadores próximos, relativamente à observada quando se encontram a maiores distâncias. Neste caso, a concentração de aceitadores é muito importante pois determina a proximidade entre dador e aceitador (Lakowics, J.R., 1999), (Slavic, J., 1994).

2.1.3 Extinção de fluorescência em estruturas organizadas

São numerosos os estudos efectuados que usam a técnica de extinção de fluorescência em micelas, monocamadas, vesículas lipídicas, membranas naturais, células e proteínas e que contribuem para o conhecimento e compreensão das suas propriedades dinâmicas e estruturais.

O fundamento para o método de extinção de fluorescência em estruturas organizadas envolve um fluoróforo solubilizado no interior da estrutura ou adsorvido à sua superfície, cuja fluorescência é desactivada pela presença de um soluto que pode estar partilhado entre a fase organizada e o solvente. A velocidade e/ou extensão com que o agente de extinção penetra na estrutura, bem como a velocidade de difusão do fluoróforo, vão determinar a cinética do processo de extinção (Blatt, E. e Sawyer, W.H., 1985).

A extinção de fluorescência em membranas tem sido usada para a determinação da acessibilidade de agentes de extinção mais ou menos lipossolúveis a fluoróforos nelas incorporados, na medição de coeficientes de partição de agentes de extinção, em estudos de localização de sondas nas membranas e na determinação de coeficientes de difusão lateral.

As relações que descrevem a extinção de fluorescência em solução devem ser transpostas criteriosamente para um meio altamente anisotrópico como é o caso da membrana lipídica, pois a aplicação de modelos de difusão tridimensionais pode não ser correcta no plano bidimensional da bicamada. Embora uma molécula relativamente pequena possa ter um comportamento semelhante ao que teria em solução homogénea quando inserida na bicamada, uma molécula de maiores dimensões com uma orientação definida deve mover-se apenas transversalmente no plano da membrana (Fato, R. *et al.*, 1986). Embora em sistemas heterogéneos se apliquem geralmente os modelos desenvolvidos para soluções, essa transposição deverá ser efectuada com ponderação. Por outro lado, há ainda que ter presente que a bicamada lipídica é constituída por uma sucessão de microambientes distintos e que eficácias relativas de desactivação diferentes para uma série de sondas pode ser reflexo da influência de um gradiente de microviscosidade desde a superfície até ao centro da bicamada.

Relativamente à transferência de energia ao nível das membranas, a sua análise faz-se aumentando a concentração de aceitador e a análise quantitativa dos dados requer o conhecimento do grau de transferência de energia esperado para os aceitadores distribuídos aleatoriamente na membrana. São necessárias várias aproximações matemáticas, assumindo-se geralmente uma distribuição bidimensional das moléculas envolvidas no processo (Lakowics, J.R., 1999).

2.1.3.1 Agentes de extinção de fluorescência

Existe uma grande variedade de substâncias que actuam como agentes de extinção de fluorescência, sendo um dos mais estudados o oxigénio molecular. Também as aminas

aromáticas e alifáticas são agentes de extinção eficientes para a maioria dos hidrocarbonetos aromáticos.

Outro grupo de agentes de extinção é o dos átomos pesados, tais como o iodo e o bromo, cujo processo de extinção de fluorescência parece resultar da passagem do sistema para um estado excitado tripleto, promovido por um acoplamento spin-órbita entre o estado excitado (singuleto) do fluoróforo e o halogénio. Visto a emissão a partir do estado tripleto ser lenta, a sua extinção, por outros processos, é favorecida.

Estes agentes incluem igualmente purinas e pirimidinas, cujo processo de extinção parece resultar da formação de complexos de transferência de carga. Os agentes de extinção colisional incluem o peróxido de hidrogénio, o óxido nítrico, nitróxidos, etc.

Devido à grande variedade de substâncias existentes, identificam-se geralmente combinações fluoróforo-agente de extinção para cada sistema em estudo, sendo importante notar que nem todos os fluoróforos sofrem extinção de fluorescência pelos mesmos agentes. Assim, o fenómeno de extinção de fluorescência depende do mecanismo de extinção que, por seu lado, está relacionado com as propriedades químicas das moléculas envolvidas no processo. Nos estudos efectuados em estruturas organizadas é muito importante notar que a eficácia da extinção depende fortemente da acessibilidade do agente de extinção face ao fluoróforo (Lakowics, J.R., 1999).

Relativamente aos ensaios efectuados neste trabalho, destinados ao reconhecimento da localização dos fármacos nas membranas lipossómicas, foi utilizado o ião iodeto como agente de extinção da fluorescência emitida pelos fármacos dotados de propriedades fluorescentes. Embora normalmente se assuma que o KI actua como agente de extinção de fluorescência apenas em ambientes hidrofílicos, existem fortes argumentos a favor da penetração membranar de alguma das formas do iodeto (KI, I^-, I_n^-, etc.), criando um gradiente de concentrações em função da profundidade da membrana. Estes resultados são sustentados pelo coeficiente de partição lípido/fase aquosa do KI em vesículas de EPC,

correspondente a um $K_p = 6 \pm 4$. Também a execução de estudos extinção de fluorescência levados a cabo pelo iodeto relativamente às sondas de ácidos *n*-9-antroiloxiesteáricos (2,3,6,7,9,10,12-AS), ácido 11-(9-antroiloxi)undecanoico (11-AU) e ácido 16-(9-antroiloxi) palmítico (16-AP) (Chalpin, D.B. e Kleinfeld, A.M., 1983), (Lacowicz, J.R., 1999) apoiam a referida teoria pois, atendendo à posição membranar das referidas sondas é possível concluir que a intensidade de extinção de fluorescência vai diminuindo à medida que aumenta a profundidade de localização das sondas nas cadeias hidrocarbonadas hidrofóbicas das vesículas, o que vem favorecer os argumentos a favor da existência de um gradiente de concentrações de KI nas membranas (Kaiser, R.D. e London, E., 1998). No entanto, estudos utilizando DPH revelaram a inexistência de extinção de fluorescência pelo iodeto, demonstrando a sua inacessibilidade relativamente ao local de posicionamento da sonda, ou a inespecificidade relativamente à interacção com o fluoróforo (Vásquez, J.L. *et al.*, 1998).

No caso dos fármacos não fluorescentes, eles próprios actuam como agentes de extinção da fluorescência emitida por sondas de localização membranar conhecida. Foram utilizadas sondas de fluorescência da série do ácido *n*-antroiloxiesteárico (*n*-AS), que são moléculas estruturalmente semelhantes contendo o mesmo grupo fluorescente (grupo antracénico) covalentemente ligado através de uma ligação éster a diferentes posições (*n*) de um esqueleto hidrocarbonado, localizado paralelamente às cadeias alifáticas dos agentes anfifílicos constituintes da bicamada.

As principais características das sondas *n*-AS são as seguintes (Blatt, E. e Sawyer, W.H., 1985):

a) os constituintes desta série têm espectros de extinção 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 solubilidade nas estruturas organizadas é favorecida em relação à solubilização em meio aquoso;

d) o valor do tempo de vida do estado excitado em diversas estruturas é conhecido.

Estas sondas têm sido amplamente estudadas no que respeita à sua localização em membranas fosfolipídicas recorrendo, nomeadamente, à difracção de raios X, à ressonância magnética nuclear, à espectroscopia de infra-vermelho, à extinção de fluorescência e à anisotropia de fluorescência (Chalpin, D.B. e Kleinfeld, A.M., 1983), (Villalaín, J. e Prieto, M., 1991), (Thulborn, K.R. *et al.*, 1979), (Zavoico, G.B. *et al.*, 1985).

A localização das sondas desta série foi também estudada em membranas naturais por polarização de fluorescência e em células intactas de eritrócitos usando a técnica de transferência de energia para a hemoglobina (Eisinger, J. e Flores, J., 1983).

Os estudos até agora efectuados revelaram que o grupo antracénico se dispõe em níveis sucessivos de profundidade de acordo com o carbono a que está ligado, situando-se na sonda 2-AS próximo da região polar das membranas fosfolipídicas e a 12-AS mais profundamente. As restantes sondas localizam-se em posições intermédias (ver Figura 3.1).

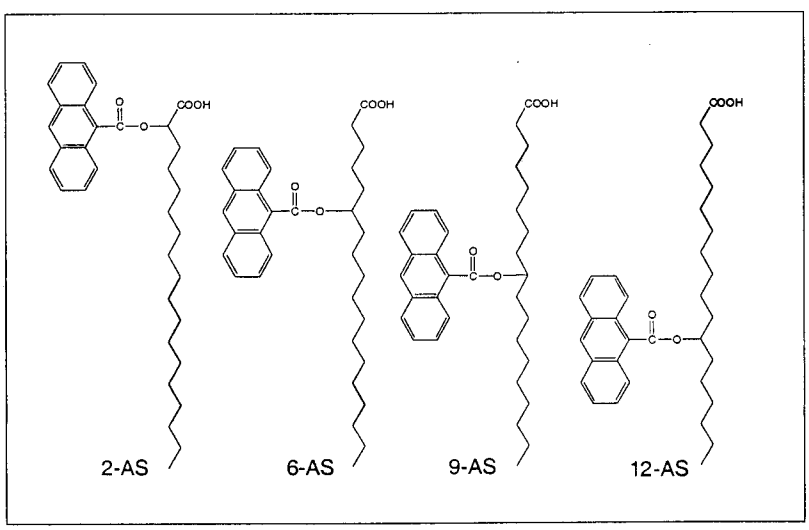


Figura 3.1 Fórmulas de estrutura das sondas *n*-AS.

As sondas *n*-AS inserem-se na membrana com a cadeia estearoíl paralela às cadeias dos fosfolípidos e o eixo longo do anel antracénico, em média, quase perpendicular ao plano da membrana, estando a ligação éster conferida de baixa mobilidade. As rotações do anel antracénico em torno dos eixos (longo e curto) parecem estar impedidas nas membranas lipídicas (Matayoshi, E.D. e Kleinfeld, A. M., 1981).

A localização das sondas nas membranas é preferencial à localização na água: Pjura *et al.* (Pjura, W. J. *et al.*, 1984) determinaram o coeficiente de partição (K_p) da sonda 12-AS em membranas de glóbulos vermelhos, plaquetas e lipossomas de fosfatidilcolina por centrifugação, desorção higroscópica e titulação fluorimétrica e concluíram situar-se no intervalo 10^2-10^5. Desta forma, a integração membranar das sondas é praticamente completa, de modo que qualquer alteração relativa à intensidade do seu espectro de emissão é dependente de fenómenos de extinção de fluorescência decorridos ao nível membranar.

2.1.3.2 Modelos matemáticos para a determinação da localização

No caso do agente de extinção absorver ao comprimento de onda de excitação do fluoróforo é necessário proceder à correcção da respectiva intensidade de fluorescência através da aplicação de uma fórmula de correcção para a excitação (Coutinho, A. e Prieto, M., 1993):

$$F_{ex} = F \cdot \frac{A_T}{A_F} \cdot \frac{1-10^{-A_F}}{1-10^{A_T}} \qquad (3.25)$$

em que F_{ex} é a intensidade de fluorescência corrigida para a excitação, F a intensidade de fluorescência das sondas, A_T a absorvância de uma solução contendo o fármaco e a sonda, na concentração dos ensaios, ao comprimento de onda de excitação da sonda e A_F a absorvância de uma solução contendo o fármaco, na concentração dos ensaios e ao comprimento de onda de excitação da sonda.

Por outro lado, considerando que o agente de extinção também absorve ao comprimento de onda da emissão do fluoróforo terá também que ser considerada a seguinte correcção:

$$F_{em} = F_{ex} \cdot \frac{2{,}303 \cdot A_0}{1-10^{-A_0}} \qquad (3.26)$$

em que F_{em} é a intensidade de fluorescência corrigida para a emissão e A_0 a absorvância de uma solução contendo o fármaco, na concentração dos ensaios, ao comprimento de onda de emissão da sonda.

Extinção de fluorescência dinâmica ou colisional. Os resultados são sempre analisados de acordo com a equação clássica de Stern-Volmer para a extinção dinâmica ou colisional (equação 3.14):

$$F_o/F - 1 = K_D[Q]$$

No caso do agente de extinção se particionar entre a fase aquosa e a fase membranar, a extinção de fluorescência é determinada apenas pela sua concentração na pseudo-fase lipídica e a equação de Stern-Volmer estará então relacionada com a concentração local de agente de extinção:

$$F_o/F - 1 = K_D[Q]_m \qquad (3.27)$$

sendo $[Q]_m$ a concentração efectiva de agente de extinção na fase membranar. $[Q]_m$ é calculado a partir da concentração total de agente de extinção $[Q]_t$ através de um factor de correcção C_f, $[Q]_m = [Q]_t \times C_f$ (Coutinho, A. e Prieto, M., 1995). O factor de correcção é dado pela expressão:

$$C_f = \left(1 - \frac{K_p \gamma_L [L]}{1 - \gamma_L [L] + K_p \gamma_L [L]}\right) \frac{K_p}{1 - \gamma_L [L]} \tag{3.28}$$

em que γ_L é o volume molar do lípido, $[L]$ é a concentração molar do lípido e K_p é o coeficiente de partição do agente de extinção.

Transferência de energia. A constante de velocidade de transferência de energia k_T é determinada pela distância entre dador e aceitador e, entre outros parâmetros, pelo grau de sobreposição espectral, descrito em termos da distância crítica de transferência ou raio de Förster (equação 3.24):

$$k_T(r) = \frac{1}{\tau_D}\left(\frac{R_0}{r}\right)^6 \quad (s^{-1})$$

A eficiência de transferência de energia para um par dador-aceitador, separados por uma distância r, é dada por:

$$E = \frac{R_0^{\,6}}{R_0^{\,6} + r^6} \tag{3.29}$$

sendo o raio de Förster calculado através da equação:

$$R_0 = 0{,}211 \left[K^2 n^{-4} \phi_0 J(\lambda)\right]^{\frac{1}{6}} \text{ (Å)} \tag{3.30}$$

em que K^2 é o factor que descreve a orientação espacial relativa dos dipolos de transição do dador e aceitador, que é igual a 2/3 no limite dinâmico isotrópico, ϕ_0 é o rendimento quântico de fluorescência do dador na ausência do aceitador (0,14 para o 2-AS e 0,55 para 12-AS), n é o índice de refracção do meio, que se assume ser 1,4 para moléculas incorporadas em

membranas biológicas e $J(\lambda)$ expressa o grau de sobreposição entre o espectro de emissão do dador e o espectro de absorção do aceitador e é dado pela expressão:

$$J(\lambda)=\int_0^{\infty} F_D(\lambda)\varepsilon_A(\lambda)\lambda^4 d\lambda \tag{3.31}$$

em que $F_D(\lambda)$ é o espectro de fluorescência normalizado do dador, $\varepsilon(\lambda)$ é o coeficiente de extinção molar ($dm^3\ mol^{-1}cm^{-1}$) do aceitador ao comprimento de onda λ.

A eficiência de transferência de energia pode calcular-se a partir da equação:

$$E=1-\frac{\int_0^{\infty} I_{DA}(t)dt}{\int_0^{\infty} I_D(t)dt} \tag{3.32}$$

onde I_{DA} corresponde ao decaimento da intensidade de fluorescência do dador na presença do aceitador, I_D corresponde ao decaimento da intensidade de fluorescência do dador na ausência do aceitador.

Para uma distribuição bidimensional e aleatória de aceitadores a equação que descreve o decaimento de fluorescência do dador é (Lakowics, J.R., 1999):

$$I_{DA}(t)=\exp\left[-\frac{t}{\tau_D}-c\left(\frac{t}{\tau_D}\right)^{\frac{1}{3}}\right] \tag{3.33}$$

com

$$c=\Gamma\left(\frac{2}{3}\right)\pi R_0{}^2 n \tag{3.34}$$

onde *n* é a concentração superficial de aceitadores e Γ representa a função gama completa. No caso do presente estudo, *n* foi determinado admitindo que metade das moléculas de fosfolípidos se encontra na membrana externa das vesículas sendo 62,2 $Å^2$ a área dos grupos polares fosfolipídicos (Loura, L.M.S. *et al.*, 2001).

A transferência de energia em estado estacionário é determinada a partir da intensidade de fluorescência relativa do dador na ausência (F_D) e na presença (F_{DA}) do aceitador:

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} \tag{3.35}$$

Os valores de F_{DA} são obtidos após correcção das intensidades de fluorescência uma vez que o aceitador absorve ao comprimento de onda de excitação do dador (Coutinho, A. e Prieto, M., 1993).

2.1.4 Anisotropia de fluorescência

As medições de anisotropia integram a vasta gama das aplicações bioquímicas da técnica de fluorescência, fornecendo informações nomeadamente, acerca do tamanho e forma de proteínas, fluidez de membranas e localização membranar de fármacos.

A anisotropia de fluorescência baseia-se no princípio da excitação fotosselectiva dos fluoróforos por luz polarizada e é medida pelo grau de polarização da luz emitida (Lakowics, J.R., 1999). Os fluoróforos absorvem preferencialmente fotões cujos vectores eléctricos estão alinhados paralelamente aos seus momentos de transição, que têm uma orientação definida relativamente aos eixos moleculares. Em soluções isotrópicas, os fluoróforos encontram-se orientados aleatoriamente. Após excitação com luz polarizada, ocorre a excitação selectiva das moléculas de fluoróforo cujo dipolo de transição é paralelo ao vector

eléctrico da excitação. Isto resulta numa população de fluoróforos parcialmente orientados e numa emissão de fluorescência parcialmente polarizada.

A despolarização da emissão pode ser causada por diversos fenómenos, cuja importância relativa depende da amostra em análise, sendo a difusão rotacional dos fluoróforos uma das causas mais comuns de despolarização. Os valores de anisotropia reflectem o deslocamento angular médio de um fluoróforo que ocorre entre a absorção e a emissão subsequente de um fotão. Quando em solução, a difusão rotacional depende da viscosidade do meio que o envolve (Lakowics, J.R., 1999).

Quando um fluoróforo é excitado com luz verticalmente polarizada (segundo uma coordenada arbitrária) (Figura 3.2), a despolarização da emissão pode ser avaliada interpondo entre a amostra e o fotomultiplicador (análise) um polarizador orientado com a mesma direcção (vertical) ou com direcção ortogonal (horizontal) à do polarizador de excitação. Nestas condições, as intensidades de fluorescência colhidas no fotomultiplicador, I_{VV} e I_{VH} respectivamente, dependem da: (a) orientação relativa dos vectores momento dipolar no estado fundamental e no estado excitado (ver Figura 3.3) e (b) redistribuição de orientações do vector momento de transição para a emissão relativamente à direcção de observação (ver Figura 3.3).

A anisotropia de fluorescência, *r*, é definida pela seguinte relação entre as intensidades de fluorescência relativas:

$$r = \frac{I_{VV} - I_{VH}.G}{I_{VV} + 2I_{VH}.G} \tag{3.36}$$

Devido às condições de simetria do sistema (Figura 3.3), o denominador da equação contabiliza toda a luz emitida pelo fluoróforo, razão pela qual a anisotropia é uma propriedade intensiva relativamente ao conjunto de fluoróforos do sistema e, portanto, quantitativa.

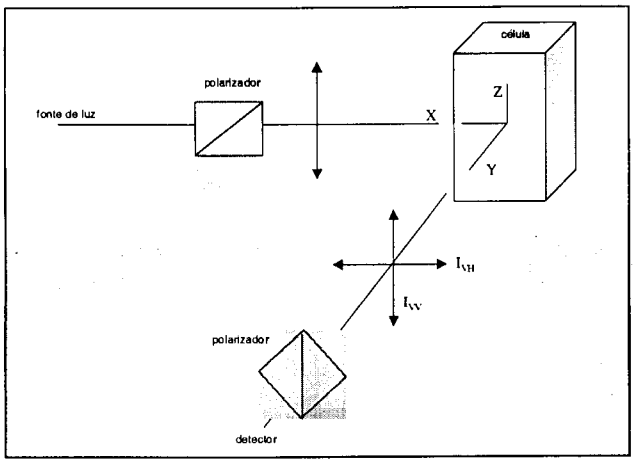


Figura 3.2 Orientação das componentes da luz polarizada - excitação e emissão - numa experiência de anisotropia de fluorescência.

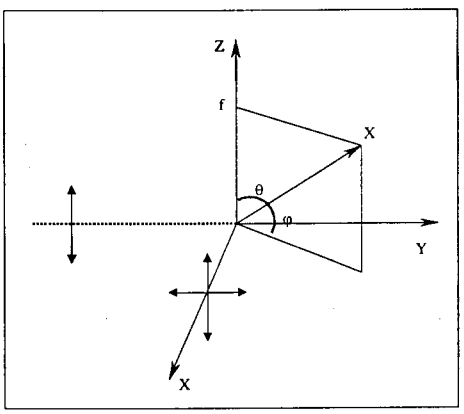


Figura 3.3 Orientação relativa (θ) dos vectores momento dipolar no estado fundamental (f) e no estado excitado (X) e redistribuição de orientações (despolarização) do vector momento dipolar (emissão) relativamente à direcção de excitação (observação) (φ).

Considerando que as propriedades de polarização molecular podem ser descritas por um tensor de 4ª ordem, o valor máximo possível que *r* pode tomar, conhecido como anisotropia limite, r_0, é inteiramente determinado por uma característica intrínseca à geometria molecular – a orientação relativa dos vectores momento dipolar, quantificada pelo ângulo φ (Figura 3.3):

$$r_0 = (3\cos^2\varphi - 1) / 5 \qquad (3.37)$$

Quando os dois vectores são colineares, a aplicação de (φ_0) à equação (3.37) mostra que r_0 é igual a 0,4 (Lakowics, J.R., 1999).

Do ponto de vista experimental, a obtenção do valor de r_0 apenas se consegue quando as moléculas se encontram imobilizadas num meio isotrópico rígido (no qual não ocorrem movimentos Brownianos) e, para efeitos práticos, apenas quando:

1) se dissolve a molécula em meios rígidos ("vidros" ou polímeros); ou
2) em experiências de anisotropia resolvida no tempo (decaimentos de anisotropia), para t=0, razão pela qual r_0 também se designa anisotropia a tempo nulo.

Existem diversos fenómenos capazes de diminuir a anisotropia para valores inferiores ao máximo, sendo, como já foi referido, a causa mais comum a difusão rotacional que ocorre durante o tempo de vida do estado excitado e desloca o dipolo de emissão do fluoróforo.

Considerando as moléculas como esferas em solução homogénea, Perrin demonstrou que a anisotropia de fluorescência em estado estacionário, r, está relacionada com o tempo de vida do fluoróforo, τ, que contabiliza o tempo característico para a emissão, e com a fluidez do meio (considerado continuo e isotrópico), que quantifica a mobilidade do mesmo, através da equação (Lakowics, J.R., 1999), (Slavic, J., 1994):

$$\frac{r_0}{r} = 1 + \frac{\tau}{\theta} \quad \text{sendo} \tag{3.38}$$

$$\theta = \frac{\eta V}{RT} \tag{3.39}$$

e τ o tempo de vida do fluoróforo. θ é o tempo de correlação rotacional do fluoróforo, sendo η a microviscosidade do meio, V o volume da unidade rotacional, R a constante dos gases perfeitos e T a temperatura absoluta.

A equação de Perrin relaciona a anisotropia com o tempo de vida e o tempo de difusão rotacional dos fluoróforos e permite calcular o valor da anisotropia esperado para um fluoróforo em diferentes solventes ou após a sua ligação a macromoléculas presentes no meio (Ikeda, T. *et al.*, 1983).

Assim, em última análise, o parâmetro ajustável da equação, *r*, é função da microviscosidade "sentida" pelos fluoróforos na pseudo-fase lipídica, que está directamente relacionado com as interacções com as moléculas existentes na sua vizinhança. Este método revela-se um dos mais indicados quanto ao objectivo dos métodos em análise, uma vez que permite caracterizar o local da membrana onde os fármacos residem, por identificação de alterações de fluidez associadas à anisotropia de fluoróforos. Também a utilização de sondas de fluorescência, de localização conhecida, usadas na ausência e na presença dos referidos fármacos, permitem determinar a sua localização.

Existem, contudo, algumas condicionantes referentes à escolha das sondas. Do ponto de vista técnico, inviabilizam a aplicação deste método (Lopes, A.M.G., 1997):

1) valores de ϕ inferiores a 0,01, uma vez que os polarizadores diminuem fortemente a intensidade dos feixes luminosos;
2) soluções que apresentem forte dispersão de luz, são um dos principais factores limitativos do método, uma vez que a dependência da intensidade de luz dispersa com a orientação do polarizador, limita muito o rigor da anisotropia quando a dispersão de luz é acentuada.

   Não obstante, existem outras condicionantes que estão relacionadas com a definição de anisotropia de fluorescência a com as variáveis de que depende:

3) a molécula do fluoróforo deve possuir, tanto quanto possível, momentos dipolares nos estados fundamental e excitado colineares, aumentando, concomitantemente, o valor de r_0;

4) por outro lado, as anisotropias intrínsecas do fluoróforo em cada meio devem ser suficientemente diferentes.

Relativamente a este último aspecto, em particular, é necessário reforçar a ideia que a anisotropia depende simultaneamente dos valores de τ (propriedade do fluoróforo) e de η (propriedade do meio), pelo que a ausência de variação de *r* com η, não implica directa e necessariamente uma ausência de associação entre o soluto e o agregado, pois pode, por exemplo, ocorrer uma variação de τ que anule o aumento esperado por um aumento de *r*.

Importa referir que estudos de anisotropia realizados com vista à detecção de alterações de fluidez membranar e localização de fármacos em vesículas lipossómicas e membranas celulares são extremamente numerosos na literatura científica (Ghosh, A. K. *et al.*, 1993), (Papahadjopoulos, D. *et al.*, 1975), (Jemiola-Rzeminska, M. *et al.*, 1996), (Antunes-Madeira, M.C. e Madeira, V.M.C., 1989).

2.1.4.1 Sondas utilizadas nos ensaios de anisotropia de fluorescência

A avaliação da fluidez membranar a partir de medições de anisotropia de fluorescência implica necessariamente a utilização de moléculas lipossolúveis cuja estrutura química permita a sua integração membranar, sendo o movimento destes fluoróforos condicionado pelo microambiente que os envolve (Slavic, J., 1994). De entre as moléculas capazes de ser usadas como sondas de fluidez ou de anisotropia de fluorescência, podem ser referidas: o DPH (1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno), o TMA-DPH (1-(-4-trimetilamoniofenil)-6-fenil-1,3,5-hexatrieno) , os ácidos *cis*-parinárico e *trans*-parinárico, o ácido 9-antraceno-dodecanoico, o ácido 1-perilenododecanoico, os ácidos n-(9-antroiloxi)esteáricos. Destas, o DPH e o TMA-DPH são as mais utilizadas nos estudos da fluidez membranar.

O DPH tornou-se nos últimos anos o marcador mais usado para estimar a microviscosidade da região hidrocarbonada membranar. O DPH só emite fluorescência em ambientes hidrofóbicos e particiona com as membranas fosfolipídicas, tanto no estado de gel como de cristal líquido (Ikeda, T. *et al.*, 1983).

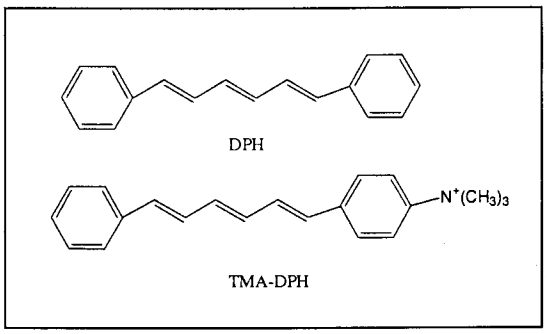


Figura 3.4 Fórmula de estrutura do DPH e do TMA-DPH.

De entre as várias razões que levaram ao seu uso generalizado devem-se destacar o coeficiente de extinção molar (80000 $M^{-1}cm^{-1}$), que permite a análise de soluções diluídas; a constância do grau de polarização entre 320 a 380 nm, o que permite a escolha dos comprimentos de onda de excitação; as suas rotações serem provavelmente isotrópicas; as rotações à volta do maior eixo da molécula serem rápidas sem deslocarem o momento de transição e portanto, sem alterarem a despolarização e, finalmente, as fases de transição das membranas serem muito nítidas com o DPH (Lakowicz, J.R., 1999).

Também o TMA-DPH, que é um derivado do DPH obtido pela introdução de um grupo trimetilamónio catiónico num dos aneis do DPH, é uma sonda anfipática muito utilizada, cuja escolha é efectuada atendendo geralmente a duas finalidades: a primeira consiste no facto da sonda possuir o grupo TMA ancorado na região de interface membranar, próximo das cabeças polares das moléculas fosfolipídicas, permitindo a observação das interacções e a determinação da localização dos fármacos nesta região, enquanto que a segunda se deve ao alinhamento do DPH paralelamente às caudas hidrocarbonadas dos fosfolípidos, permitindo a detecção de alterações de fluidez da membrana (Moya-Quiles, M.R. *et al.*, 1996).

Uma outra vantagem da utilização destas sondas consiste também no facto delas não apresentarem praticamente fluorescência em água, isto é, a intensidade de fluorescência emitida aumenta cerca de 10 000 vezes após inserção das sondas nas

membranas lipídicas, tornando negligenciável uma possível fluorescência de fundo que possa existir (Slavic, J., 1994).

Os coeficientes de partição lípido/água, foram calculados para o DPH (1,3 x 10^6) e para o TMA-DPH (2,4 x 10^5) (Slavic, J., 1994).

Relativamente à localização das sondas, vários estudos revelaram que o DPH, bem como os seus derivados, se encontram inseridos no interior das membranas a profundidades semelhantes (Kaiser, R.D. e London, E., 1998). A localização dos derivados do DPH pode ser explicada pelo comprimento da cadeia insaturada do DPH e pela sua orientação paralelamente às caudas hidrofóbicas dos fosfolípidos membranares. Estes factores permitem a acomodação dos grupos carregados das moléculas de DPH ao nível da superfície polar enquanto se mantém uma localização profunda do DPH. Assim, o TMA-DPH está localizado a uma profundidade inferior ao DPH de apenas 3 Å (11 Å vs 8 Å) sendo estes valores referentes às distâncias dos fluoróforos ao centro da bicamada membranar (Kaiser, R.D. e London, E., 1998).

Os resultados de anisotropia de fluorescência (*r*) são sempre analisados pela equação (3.36):

$$r = \frac{I_{VV} - I_{VH}.G}{I_{VV} + 2I_{VH}.G} \qquad (3.36)$$

sendo I_{VV} e I_{VH} as intensidades de luz medidas paralela e perpendicularmente ao feixe de excitação polarizado na vertical e *G* um factor de correcção que corresponde à sensibilidade do sistema de detecção para a luz polarizada, na vertical e horizontal. O factor de correcção G é definido pela razão entre os componentes verticais e horizontais quando a luz de excitação está polarizada na direcção horizontal (Lakowics, J.R., 1999):

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \qquad (3.40)$$

2.2 Ressonância magnética nuclear: aplicações da técnica de RMN ao estudo da localização membranar dos fármacos

A ressonância magnética nuclear é uma técnica excelente no que respeita ao fornecimento de informações, mais ou menos detalhadas, acerca das interacções de diversos fármacos com estruturas membranares.

De uma maneira geral, os espectros de RMN podem ser caracterizados por diversos parâmetros, entre os quais: o campo magnético onde ocorre a ressonância, dependente do ambiente magnético que envolve o átomo considerado (^{1}H, ^{13}C, ^{31}P, etc.), o grau de acoplamento spin-spin e as constantes de relaxação longitudinal e transversal (Morrison, R. e Boyde, R. 1990). Após a interacção das moléculas de fármaco com os lipossomas, um ou vários destes parâmetros podem ser alterados, permitindo a localização e quantificação das alterações efectuadas (Seydel, J.K. 1991).

Na literatura é possível encontrar diversos estudos que utilizam a espectroscopia de RMN como técnica de avaliação da estrutura e das características de diferentes membranas naturais e sintéticas, tais como: quantificação de lípidos por ^{13}C-RMN (Wary, C. *et al.*, 1996), estudos de transição de fase por ^{31}P-RMN (Huang, Z. e Epand, R.M. 1997), análise de alterações estruturais de lipoproteínas por ^{1}H-RMN (Ala-Korpela, M. *et al.*, 1995), entre outros.

Relativamente à interacção de fármacos com membranas, a espectroscopia de RMN permitiu também efectuar estudos acerca da interacção da procaína e tetracaína com moléculas fosfolipídicas dispersas numa fase aquosa (Hauser, H. *et al.*, 1969), estudos sobre a interacção de bloqueadores-β com vesículas lipossómicas de DMPC na presença do catião Pr^{3+} (Betageri, G.V. *et al.*, 1989), análise das interacções ocorridas entre vesículas fosfolipídicas de fosfatidilcolina e fármacos anti-inflamatórios (Venema, F.R. e Weringa, W.D. 1988), estudos de ^{2}H-RMN e ^{31}P-RMN acerca da interacção do clorofórmio com

membranas de fosfatidilcolina (Phonphok, N. *et al.*, 1996) e estudos da interacção do antibiótico nisina com membranas de DMPC e DMPG (Bonev, B.B. *et al.*, 2000).

Devido à sua natureza coloidal, os lipossomas proporcionam a obtenção de espectros de ressonância magnética nuclear protónica (^{1}H-RMN) e de fósforo 31 (^{31}P-RMN) de elevada resolução, constituindo também modelos excelentes para o estudo das interacções de iões metálicos com as membranas biológicas. Os lantanídeos têm sido, por isso, muito utilizados nos estudos de RMN como indutores de deslocamento químico relativamente aos picos correspondentes aos grupos polares fosfolipídicos, sendo a base de alguns dos trabalhos referidos anteriormente. Esses deslocamentos são sensíveis à presença de determinados fármacos indicando, deste modo, interacções moleculares fármaco-lípido ao nível dos grupos polares.

Desde a década de 70 que é possível encontrar publicações sobre a interacção dos lantanídeos com estruturas membranares, tais como os trabalhos realizados em 1971 que permitiram concluir que a adição de európio (Eu^{3+}) a uma suspensão de lipossomas de fosfatidilcolina provocava, no espectro de ^{1}H-RMN, um deslocamento para campos mais altos do pico correspondente aos protões dos grupos colina das moléculas de lecitina localizadas na face externa das membranas, mas não exercia qualquer efeito na ressonância dos grupos colina da superfície interna da bicamada membranar fosfolipídica (Bystrov, V.F. *et al.*, 1971). Em 1972 surgiram os primeiros estudos com o catião praseodímio (Pr^{3+}), tendo-se observado também a ocorrência de um deslocamento mas, neste caso, para campos mais baixos (Bystrov, V.F. *et al.*, 1972). Em 1973, efectuaram-se diversos ensaios de ressonância magnética nuclear protónica e de 13C com vista ao estudo da interacção dos iões paramagnéticos lantânio (La^{3+}), európio (Eu^{3+}) e neodímio (Nd^{3+}) com vesículas de lecitina (Levine, Y.K. *et al.*, 1973) e em 1998 foi publicado um trabalho sobre a interacção dos iões túlio (Tm^{3+}), itérbio (Yb^{3+}), érbio (Er^{3+}) e európio (Eu^{3+}) com membranas de DMPC e DHPC (Prosser, R. S. *et al.*, 1998).

Foi com base nestes ensaios de interacção dos lantanídeos com as estruturas membranares, que se realizaram os estudos ^{1}H-RMN referentes à interacção dos diferentes fármacos abordados com as vesículas lipossómicas unilamelares de DMPC.

Face a todo o trabalho desenvolvido nesta área ao longo das últimas três décadas, a importância da técnica de ressonância magnética nuclear tem vindo a aumentar, nomeadamente no que respeita ao conhecimento de aspectos relacionados com a interacção dos fármacos com as membranas, seu transporte, localização, efeitos farmacológicos, selectividade tecidular, formas de resistência e toxicidade.

PARTE SEGUNDA

A metodologia

Capítulo 4 | METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Neste capítulo descrevem-se as condições experimentais globais utilizadas, bem como a instrumentação, os reagentes e a preparação das soluções. As condições experimentais específicas de cada técnica serão descritas nos capítulos a elas respeitantes. É apresentada também a nomenclatura geral usada na descrição das constantes de partição e, por fim, são descritos, de maneira sucinta, os programas computacionais que permitiram todos os cálculos e a interpretação dos resultados obtidos pelos diferentes métodos.

1 Reagentes e Soluções

A rifampicina, isoniazida, dibucaína e griseofulvina foram adquiridas à Sigma; o clordiazepóxido foi uma oferta da Hoffman-La Roche e a grepafloxacina da Glaxo-Wellcom. Os referidos fármacos foram armazenados a 0 °C, na ausência de luz, e utilizados sem qualquer purificação adicional.

Os lípidos L-α-dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), L-α-dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG) e L-α-dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) foram adquiridos à Avanti Pollar Lipids, armazenados a -18 °C e utilizados também sem purificação adicional.

O ácido *N*-(2-hidroxietil)piperazina-*N*´-etanessulfónico (Hepes), o cloreto de praseodímio heptahidratado e o óxido de deutério (D_2O 99,8%) foram obtidos na Sigma, bem como o 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH), o 1-(4-trimetilamoniumfenil)-6-fenil-1,3,5-hexatrieno (TMA-DPH), o ácido 2-(9-antroiloxi)esteárico (2-AS) e o ácido 12-(9-antroiloxi)esteárico (12-AS). Os lantanídeos foram adquiridos à Alfa-Æsar. Os restantes reagentes foram obtidos da Merck (qualidade *pro analisy*).

A água utilizada para a realização dos ensaios foi previamente sujeita a dupla desionização, apresentando uma condutividade inferior a 0,1 μScm^{-1}.

As soluções de fármacos utilizadas em cada realização experimental foram obtidas por diluição rigorosa de soluções mais concentradas, preparadas em tampão Hepes 10 mM, pH 7,4 e força iónica ajustada a 0,1 M com NaCl e mantidas ao abrigo da luz a 4 °C. Também as suspensões lipossómicas foram preparadas em tampão Hepes e utilizadas num período nunca superior a três dias após a altura da preparação.

As soluções padrão de diidrogenofosfato de potássio utilizadas no doseamento dos lípidos foram obtidas por diluição rigorosa de uma solução mais concentrada e o reagente de Fiske & Subbarow foi sempre preparado extemporaneamente.

As soluções de hidróxido de sódio usadas nos ensaios potenciométricos foram preparadas sob atmosfera de árgon, a partir de uma solução de hidróxido de sódio a 50% e utilizando água bidesionizada previamente fervida. O título das soluções diluídas foi determinado por titulação com ácido clorídrico padrão (TITRISOL, Merck), imediatamente antes da sua utilização (Gameiro, P. *et al.*, 2000).

A preparação das soluções de 2-AS e 12-AS foi efectuada usando como solvente uma mistura de metanol/clorofórmio (1:3).

2 Instrumentação utilizada

Todas as determinações espectrofotométricas de ultravioleta/visível foram efectuadas a 37,0 ± 0,1 °C usando um espectrofotómetro UNICAM UV-300, equipado com um acessório de controlo de temperatura por circulação de água termostatizada. Foi utilizada uma largura de fenda de 1mm e cubas de quartzo com um passo óptico de 1cm.

Os estudos de fluorescência foram efectuados utilizando um espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 50 também equipado com um sistema de termostatização.

As determinações por RMN foram efectuadas à temperatura de 37,0 °C num espectrómetro Bruker AC 200, operando a 200 MHz para ^1H. A regulação de campo-frequência foi baseada na frequência de ressonância do deutério, fornecida por D_2O contido num tubo capilar de vidro selado imerso nas amostras das soluções aquosas.

Todas as pesagens foram efectuadas numa balança analítica Mettler AT201($\pm 2x10^{-5}$g).

Para a preparação de lipossomas unilamelares utilizou-se um extrusor da Lipex Biomembranes de 10 ml e filtros de policarbonato Nucleopore-Corning.

Para a determinação dos coeficientes de partição por separação de fases foi usada uma ultracentrífuga Sorvall Du Pont Model OTD 75B e uma centrifuga Kubota 6900. Utilizaram-se também tubos Centricon® 30.000 da Amicon.

A granulometria dos lipossomas foi estudada num Zeta Sizer 5000 (Malvern), equipado com um laser de hélio-néon, com uma potência de 5 mW, emitindo a 633 nm.

As titulações potenciométricas foram efectuadas, sob atmosfera de árgon, numa célula termostatizada de paredes duplas, a uma temperatura constante de 25,0 ± 0,1 °C mantida por recirculação de água com um circulador GFL 5002. Utilizou-se um sistema automático de titulação composto por uma bureta da marca Crison 2031 e um decimilivoltímetro Crison 2002, ligados através de uma interface RS 232C a um computador Unisys. Como eléctrodo de referência utilizou-se um Orion 900029/4 (Ag/AgCl) e como eléctrodo de vidro sensível ao catião hidrogénio um eléctrodo Russel SWL. A homogeneização das soluções foi obtida com um agitador magnético Crison 2038.

3 Preparação dos lipossomas

O processo utilizado na preparação de lipossomas consistiu no método originalmente descrito por Bangham (Bangham, A.D. *et al.*, 1965), (Bangham, A.D. *et al.*, 1965a).

Resumidamente, as vesículas lipossómicas foram preparadas em balão de fundo redondo de 50 ml, por evaporação à secura, sob corrente de árgon, de uma solução de clorofórmio (DMPC e DPPC) ou de uma mistura clorofórmio:metanol 3:1 (DMPG), sendo a escolha dos solventes ditada pela necessidade de obter filmes lipídicos uniformes. Após evaporação, os filmes foram mantidos durante a noite sob vácuo para garantir a completa evaporação dos solventes e, em seguida, procedeu-se à sua ressuspensão por adição de

uma solução aquosa de tampão Hepes 10 mM (pH 7,4, 0,1M NaCl) contendo ou não os fármacos em estudo, obtendo-se, após agitação em vórtice a uma temperatura superior à temperatura de transição de fase, uma dispersão de vesículas multilamelares (MLV). Estas vesículas foram posteriormente sujeitas a cinco ciclos de congelação-descongelação, usando para tal azoto líquido e um banho de água termostatizada. A suspensão lipídica foi depois estabilizada a uma temperatura controlada de 37 °C e ao abrigo da luz durante 30 minutos e usada sem qualquer processamento adicional nos ensaios com MLV, ou sujeita a extrusão para obtenção de lipossomas unilamelares (LUVs). A extrusão foi efectuada num extrusor Lipex a uma temperatura superior à temperatura de transição de fase, a 250 bar e em corrente de árgon, fazendo passar dez vezes a suspensão de vesículas multilamelares por membranas de policarbonato de poros de 100 nm de diâmetro. Obteve-se finalmente uma suspensão de aspecto translúcido, constituída por lipossomas com um diâmetro médio de 100 nm.

4 Granulometria dos lipossomas

A granulometria dos lipossomas foi estudada por espectroscopia de correlação fotónica num Zeta Sizer 5000. As medições realizaram-se a 25 °C, numa célula constituída por um capilar cilíndrico submerso num banho de água, termostatizado por uma sonda que mantém uma precisão térmica de ± 0,1 °C. Utilizaram-se para a realização dos ensaios suspensões lipossómicas com concentração aproximada de 1,5 mM.

5 Determinação do potencial-zeta dos lipossomas

As amostras foram colocadas na célula utilizada nos estudos de granulometria, célula esta munida de dois eléctrodos, que geram um campo eléctrico de 80 V/cm, e dois raios laser cruzados que interferem entre si e formam um conjunto de barras de interferência com espaçamento conhecido. Todas as determinações foram efectuadas a 25,0 °C e os valores obtidos resultam da média de dez leituras para cada amostra.

6 Verificação da estabilidade das preparações lipossómicas

Relativamente à estabilidade no tempo, foram analisadas por espectrofotometria de correlação fotónica, durante um período de 10 dias, formulações lipossómicas multilamelares e unilamelares de DMPC e DMPG, preparadas em tampão Hepes, com vista à detecção de possíveis alterações das dimensões das vesículas por fenómenos de agregação ou fusão. As suspensões foram armazenadas a 4 °C na ausência da luz.

Foi também avaliada a estabilidade química, relativamente a fenómenos de oxidação, por espectrofotometria de ultravioleta-visível (ver estabilidade química no Capítulo 1).

7 Doseamento dos lípidos

A determinação da concentração fosfolipídica das suspensões lipossómicas em estudo efectuou-se, de forma indirecta, pela quantificação do conteúdo em fosfato das amostras, de acordo com o método de Bartlett modificado.

O protocolo analítico adoptado consistiu na adição da 0,4 ml de ácido perclórico a 0,5 ml de cada amostra e soluções padrão de fosfato de potássio, seguida de aquecimento a uma temperatura compreendida entre 180-200 °C durante 45 minutos. Após arrefecimento dos tubos à temperatura ambiente adicionaram-se 4,6 ml de molibdato de amónio e 0,2 ml de reagente de Fiske & Subbarrow. Colocam-se depois os tubos em banho de água a 100 °C durante 7 minutos e por fim procede-se à leitura da respectiva absorvância a 830 nm.

8 Doseamento dos fármacos

A determinação da concentração dos fármacos nas amostras em estudo efectuou-se por espectrofotometria de ultravioleta-visível e espectrofotometria de fluorescência, por interpolação dos valores de intensidade de absorvância e fluorescência obtidos, ao comprimento de onda máximo de absorção ou emissão, numa curva de calibração construída a partir de sete soluções de concentração crescente. Estas, foram preparadas por diluição de uma solução concentrada obtida por pesagem rigorosa e dissolução no solvente

apropriado. O intervalo de concentrações das soluções de calibração foi escolhido por forma a que se verificasse a lei de Lambert-Beer e com coeficientes de correlação iguais ou superiores a 0,999 para cada um dos fármacos.

9 Determinação das constantes de acidez dos fármacos

A calibração do sistema realizou-se antes de cada ensaio por titulação de 20,00 ml de uma solução padrão de ácido clorídrico 0,001 M (I=0,1 M em NaCl) com uma solução de hidróxido de sódio sensivelmente 0,02 M (I=0,1 M em NaCl), pelo método de Gran e com a equação de Nernst.

As constantes de acidez foram determinadas por titulação de 20,00 ml de solução aquosa dos fármacos (I=0,1 M em NaCl e 0,001 M em HCl) de concentrações no intervalo de 0,001 M a 0,00025 M com NaOH ≈ 0,02 M (I=0,1 M em NaCl). Todas as determinações foram realizadas a 25 °C, sob atmosfera de árgon.

O cálculo das constantes de acidez foi efectuado com os programas Superquad (Gans, P. *et al.*, 1985) e Hyperquad (Gans, P. *et al.*, 1996), que consideram como variável dependente a diferença de potencial e como variável independente o volume de titulante adicionado em cada ponto da titulação. Os resultados apresentados são a média dos valores de pelo menos seis titulações independentes.

10 Coeficientes de partição

10.1 Determinação dos coeficientes de partição por espectrofotometria derivativa de UV-Vis

A determinação dos coeficientes de partição (K_p) por este método efectuou-se com vesículas lipossómicas unilamelares de DMPC e DMPG preparadas em tampão Hepes na ausência dos fármacos.

Utilizaram-se dois grupos de oito microtubos de 1,5 ml, sendo um destinado às amostras e o outro às suspensões de referência. As amostras foram obtidas por adição de

um determinado volume de solução de fármaco a volumes crescentes da suspensão de vesículas lipossómicas e tampão Hepes até perfazer 1,5 ml. As respectivas suspensões de referência foram preparadas da mesma forma mas sem fármaco.

Procedeu-se finalmente à agitação dos microtubos em vórtice durante 5 minutos seguida de incubação a 37 °C durante 30 minutos.

Os espectros de absorção foram traçados num espectrofotómetro UNICAM UV-300, a 37 °C, a uma velocidade de varrimento de 250 nm/min, em células de quartzo de 10 mm de passo óptico e com uma fenda de 1 mm. Utilizaram-se dois procedimentos diferentes para a correcção dos espectros. Num deles, os espectros das amostras foram traçados contra as respectivas suspensões de referência e no outro, os espectros das amostras e suspensões de referência foram traçados contra uma solução de tampão Hepes e posteriormente subtraídos. Obtiveram-se nos dois casos espectros de absorção corrigidos idênticos.

Os espectros de primeira, segunda e terceira derivadas foram calculados a partir dos espectros de absorção corrigidos usando o algoritmo de Savitzky-Golay (Savitzeky, A., Golay, M.J.E., 1964) o qual utiliza uma convolução polinomial de segunda ordem de 13 pontos e um intervalo de comprimentos de onda ($\Delta\lambda$) de 0,5 nm (subrotinas do Microcal Origin 5.0).

10.2 Determinação dos coeficientes de partição por espectrofluorimetria

Foram efectuadas algumas determinações de coeficientes de partição por espectrofluorimetria, nas quais se manteve o procedimento experimental de preparação das amostras e suspensões de referência descrito para o método de determinação por espectrofotometria derivativa de UV-Vis. Os espectros de emissão de fluorescência foram traçados a 37 °C num espectrofluorímetro Perkin Elmer, utilizando células de quartzo de 10 mm x 10 mm. A escolha dos comprimentos de onda de excitação e de emissão, bem como das fendas, efectuou-se de acordo com os fármacos em estudo.

10.3 Determinação dos coeficientes de partição por separação de fases

As suspensões de lipossomas unilamelares utilizadas nestes ensaios foram obtidas por ressuspensão dos filmes lipídicos na presença e na ausência dos fármacos, seguida de extrusão por membranas de policarbonato de 100nm de poro. No primeiro caso, prepararam-se dois filmes lipídicos idênticos, sendo um deles ressuspenso com 3 ml de solução de fármaco em Hepes e o outro ressuspenso com igual volume de tampão Hepes e usado como referência. No segundo caso, prepararam-se igualmente dois filmes lipídicos idênticos, ambos ressuspensos com tampão Hepes, a um dos quais se adicionou posteriormente um determinado volume de solução de fármaco e ao outro, igual volume de Hepes.

A separação das fases lipídica e aquosa efectuou-se após transferência de 1,5 ml de cada uma das suspensões para os reservatórios de amostra dos tubos Centricon® (Amicon) e centrifugação numa centrífuga Kubota 6900 a 5000 g e a 37 °C até que praticamente toda a solução aquosa das suspensões lipídicas atravessasse a membrana dos tubos e fosse recolhida nos reservatórios destinados ao filtrado (ver Figura 4.1).

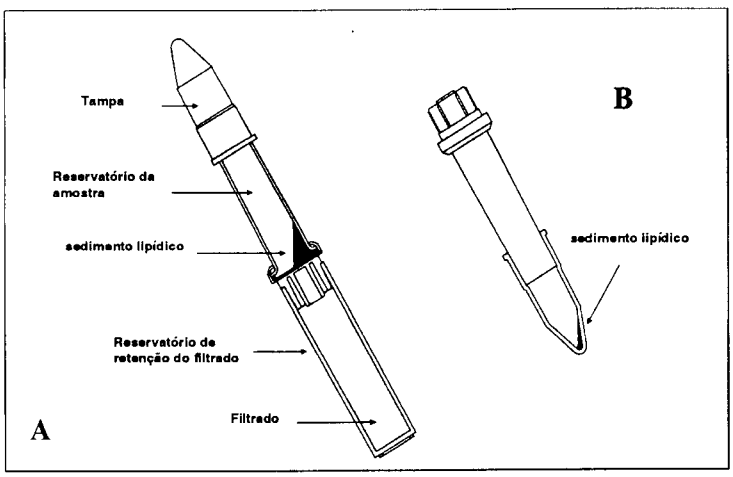


Figura 4.1 Separação de fases usando tubos Centricon. **A** Representação dos tubos durante a separação de fases por ultra-filtração. Os lipossomas ficam retidos na membrana existente no reservatório onde é colocada a amostra, passando a fase aquosa para o reservatório de recolha dos filtrados. **B** Representação da posição dos reservatórios da amostra durante a centrifugação para recolha da fase lipídica.

Seguiu-se a recolha dos filtrados e uma lavagem com tampão Hepes, com nova centrifugação até ficarem retidos na membrana apenas cerca de 100 µl de suspensão. As suspensões lipossómicas retidas no filtro são recolhidas por inversão dos tubos e nova centrifugação, após terem sido retirados os reservatórios dos filtrados. Os sedimentos lipídicos foram depois ressuspensos ao volume inicial com Hepes.

Durante todo este procedimento retiraram-se alíquotas das suspensões para a quantificação dos fármacos e dos lípidos antes da centrifugação e após a ressuspensão dos sedimentos. O doseamento dos fármacos fez-se espectrofotometricamente, após diluição das alíquotas referidas com etanol 99,8%, utilizado para proceder à lise das vesículas, e interpolação dos valores de absorvância, lidos a um determinado comprimento de onda, numa recta de calibração elaborada com os valores obtidos com soluções etanólicas de concentração crescente do fármaco. O doseamento dos lípidos foi efectuado pelo método de Bartlett modificado descrito atrás.

Relativamente aos ensaios com LUVs de DMPG efectuou-se também a separação de fases por ultracentrifugação. Prepararam-se suspensões de lipossomas unilamelares de DMPG na presença dos fármacos e as respectivas suspensões de referência e procedeu-se à separação de fases por ultracentrifugação a 100.000g durante 2 horas à temperatura de 37 °C. Finalmente recolheram-se os sobrenadantes ficando os sedimentos lipídicos depositados nas paredes dos tubos de centrifugação. O doseamento dos fármacos efectuou-se por espectrofotometria de UV-Vis, após ressuspensão e diluição ao volume inicial com tampão Hepes.

11 Estudos de fluidez e localização

11.1 Extinção da fluorescência de fármacos pelo ião iodeto

Utilizou-se como agente de extinção ou "quencher" de fluorescência uma solução de iodeto de potássio (KI) preparada extemporaneamente, à qual foi adicionada uma solução de tiossulfato de sódio (0,1 mM) de modo a impedir a formação do ião I_3^-. Antes de cada ensaio

procedeu-se ao doseamento do ião iodeto por titulação, numa mistura imiscível de tetracloreto de carbono e ácido clorídrico concentrado, com uma solução padrão de iodato de potássio (KIO_3) (Vogel, A. I., 1948). A preparação das amostras efectuou-se em microtubos de 1,5 ml, pela adição de concentrações crescentes de KI (0,001 M a 0,2 M) a cada um dos grupos de oito microtubos contendo diferentes concentrações de suspensão lipídica (0 μM, 500 μM e 700 μM) e um mesmo volume da solução do fármaco em estudo. As suspensões foram depois agitadas num agitador de vórtice durante 5 minutos e incubadas a 37 °C durante 30 minutos. As leituras da intensidade de fluorescência foram efectuadas também a 37,0 ± 0,1 °C, aos comprimentos de onda máximos de excitação e de emissão dos fármacos.

11.2 Extinção de fluorescência das sondas 2-AS e 12-AS por fármacos

Estes estudos foram realizados com fármacos não fluorescentes que, de acordo com a sua localização membranar, actuam como agentes de extinção mais ou menos potentes da fluorescência emitida pelas sondas 2-AS e 12-AS.

Quanto à preparação das amostras esta foi realizada pelo método de injecção das sondas de fluorescência dissolvidas em etanol, na suspensão de vesículas unilamelares de DMPC e DMPG preparadas em tampão Hepes pelo método de hidratação descrito. A quantidade de solução etanólica em cada amostra foi sempre inferior a 2% (v/v), percentagem para a qual não estão descritas quaisquer alterações na estrutura das membranas (Coutinho, A. *et al.*, 1990), (Moreno, M. J. e Prieto, M. 1993). Após a injecção, seguiu-se um período de incubação de aproximadamente 1 hora, para garantir a incorporação total das sondas na bicamada lipídica. As suspensões de lipossomas "marcados" com as sondas foram depois utilizadas para preparar as várias séries de amostras, contendo uma determinada concentração de lípido e concentrações crescentes de fármaco, de modo a manter a proporção final lípido/sonda de 100:1 (Chalpin, D. B. e Kleinfeld, A. M., 1983).

As leituras de fluorescência foram efectuadas após um segundo período de incubação de 2 horas a 37 °C aos comprimentos de onda máximos de excitação (390 nm) e de emissão das sondas (452 nm no caso da sonda 2-AS e 446 nm no caso da sonda 12-AS).

11.3 Estudos de anisotropia de fluorescência

As suspensões de lipossomas unilamelares utilizadas nos estudos de anisotropia foram preparadas por evaporação à secura de soluções clorofórmicas de DMPC, ou soluções de clorofórmio/metanol de DMPG, contendo os fluoróforos DPH ou TMA-DPH dissolvidos no mesmo solvente orgânico, sendo a ressuspensão dos filmes efectuada com tampão Hepes.

Às LUVs assim obtidos adicionou-se depois um volume apropriado de solução de fármaco ou de tampão Hepes, no caso das suspensões de referência, e procedeu-se à incubação por um período de 30 minutos a 37 °C. A razão lípido-fluoróforo utilizada foi aproximadamente 300:1.

Os estudos de anisotropia de fluorescência foram efectuados num intervalo de temperaturas compreendida entre 15 °C e 40 °C, sendo a temperatura das amostras verificada com uma precisão de aproximadamente 0,1 °C. Relativamente ao DPH, o comprimento de onda de excitação foi fixado em 336 nm e o de emissão em 450 nm. No que respeita ao TMA-DPH, promoveu-se a excitação a 355 nm e observa-se a emissão a 427 nm. Em todos os casos a intensidade de fluorescência emitida pelos fármacos a estes comprimentos de onda era desprezável.

12 Estudos de ressonância magnética nuclear protónica

Procedeu-se à preparação de LUVs de DMPC segundo o método anteriormente descrito, sendo a ressuspensão dos filmes lipídicos efectuada com 3,5 ml de óxido de deutério (D_2O 99,8%).

Preparam-se também em D_2O soluções dos diferentes fármacos e uma solução mãe de praseodímio (Pr^{3+}) de concentração 0,2 M. As amostras foram obtidas por adição de diferentes volumes de soluções de fármaco e de solução de Pr^{3+} a alíquotas de suspensão lipídica, por forma a obter uma concentração final de DMPC de 14 mM.

Os espectros foram traçados a 37,0 °C e o pico HDO foi utilizado como referência interna com valor de deslocamento químico de 4,63 ppm.

PARTE TERCEIRA

Os resultados

Capítulo 5 DETERMINAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS LIPOSSOMAS E FÁRMACOS

1 Caracterização das vesículas lipossómicas

Neste capítulo descrevem-se algumas características físico-químicas dos lipossomas, nomeadamente a sua granulometria e valor do potencial-zeta na presença e na ausência dos fármacos, bem como a sua estabilidade durante um período de tempo definido. Inclui também um estudo acerca das propriedades de ácido-base dos fármacos, aspecto importante no que respeita à compreensão das suas interacções com as vesículas lipossómicas, nas condições dos ensaios.

1.1 Granulometria dos lipossomas

Na Tabela 5.1 encontram-se representados os diâmetros e respectivos índices de polidispersão das vesículas unilamelares de DMPC e DMPG na ausência e na presença dos fármacos em estudo. Relativamente às vesículas multilamelares, obtiveram-se valores médios de 1524,0 e 295,5 para o DMPC e DMPG, respectivamente.

Tabela 5.1 Diâmetros e respectivos índices de polidispersão das vesículas unilamelares de DMPC e DMPG na ausência e na presença dos fármacos.

	DMPC		DMPG	
	Diâm.	Poli.	Diâm.	Poli.
Lípido	106,6	**0,11**	99,8	0,04
Clordiazepoxido	97,7	**0,07**	100,8	0,03
Rifampicina	104,9	**0,06**	97,8	0,12
Isoniazida	96,4	**0,08**	97,6	0,06
Griseofulvina	101,0	**0,07**	95,8	0,17
Grepafloxacina	108,7	**0,12**	98,6	0,04
Norfloxacina	102,3	**0,09**	99,2	0,07

Verifica-se que após extrusão os lipossomas originam populações homogéneas e com baixo índice de polidispersão, não se observando alterações da granulometria na presença dos fármacos.

1.2 Determinação do potencial-zeta dos lipossomas

Os valores dos potenciais-zeta das vesículas lipossómicas unilamelares de DMPC e DMPG, na ausência e na presença dos fármacos, encontram-se representados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 Potenciais-zeta[a] das vesículas lipossómicas unilamelares de DMPC e DMPG, na ausência e na presença dos fármacos.

	DMPC	DMPG
	Potencial-zeta (mV)	
Lípido	-2,5 ± 0,2	-53,4 ± 1,6
Clordiazepoxido	-1,8 ± 1,1	-57,1 ± 2,0
Rifampicina	-3,5 ± 0,7	-55,5 ± 2,6
Isoniazida	-1,9 ± 2,5	-51,5 ± 3,0
Griseofulvina	-2,0 ± 0,9	-42,5 ± 5,1
Grepafloxacina	-1,2 ± 0,4	-43,4 ± 3,2
Norfloxacina	-1,9 ± 1,6	-52,6 ± 3,5

[a] Os resultados correspondem à média de 2 ensaios independentes, sendo o valor obtido em cada ensaio a média de dez leituras da mesma amostra.

A análise da tabela revela a existência de uma alteração do potencial-zeta das vesículas unilamelares de DMPG na presença da griseofulvina e da grepafloxacina, o que sugere a interacção destes fármacos na zona das cabeças polares carregadas negativamente do dimiristoilfosfatidilglicerol, apontando para uma localização preferencial a este nível.

1.3 Estabilidade das formulações lipossómicas

Analisando os resultados de granulometria obtidos, podemos concluir que durante um período de 10 dias não se observaram alterações significativas no tamanho médio das vesículas unilamelares, mantendo-se a homogeneidade das suspensões como se pode verificar pela pequena variação do índice de polidispersão. Relativamente às vesículas multilamelares de DMPC verificou-se um aumento do diâmetro médio, traduzindo fenómenos de agregação. O mesmo não aconteceu com as vesículas multilamelares de DMPG cuja carga eléctrica, neste caso negativa, deverá ter contribuído para a sua estabilidade física, impedindo fenómenos de agregação e/ou fusão.

Tabela 5.3 Estabilidade em tampão Hepes, à temperatura de 4 °C, de vesículas lipossómicas multilamelares (MLV) e unilamelares (LUV) de DMPC e DMPG: dimensão das vesículas (nm) e homogeneidade das suspensões.

	MLV				LUV			
Tempo	DMPC		DMPG		DMPC		DMPG	
(dias)	Diâm.	Poli.	Diâm.	Poli.	Diâm.	Poli.	Diâm.	Poli.
0	1524,0	1,0	295,5	0,65	102,0	0,04	103,0	0,04
10	1856,5	1,0	305,4	0,66	101,5	0,02	104,0	0,10

Relativamente à estabilidade química procedeu-se ao traçado dos espectros de UV-Vis, não sendo observados quaisquer fenómenos de oxidação.

2 Propriedades de ácido-base dos fármacos

A actividade biológica dos fármacos é condicionada muitas vezes pelas suas propriedades ácido-base, visto o grau de ionização das moléculas estar intimamente ligado à lipossolubilidade que, por sua vez, se relaciona com o transporte através das membranas (Schreier, S. *et al.*, 1984).

Neste trabalho procedeu-se ao cálculo, por potenciometria, das constantes de acidez (pK_a) de alguns fármacos, nomeadamente da grepafloxacina, norfloxacina e rifampicina, cujos valores não se encontravam descritos na literatura. As determinações foram efectuadas em condições experimentais bem definidas.

Utilizou-se um sistema automático de titulação composto por uma bureta automática Crison 2031 e um decimilivoltímetro Crison 2002, ambos controlados por um computador Unisys, que permite o controlo das condições experimentais e a aquisição dos resultados. Utilizou-se como eléctrodo indicador um eléctrodo de vidro sensível ao catião hidrogénio e como eléctrodo de referência um eléctrodo de prata/cloreto de prata. Todas as titulações foram efectuadas a 25,0 ± 0,1 °C, sob corrente de árgon. O esquema do sistema automático de titulação encontra-se representado na Figura 5.1.

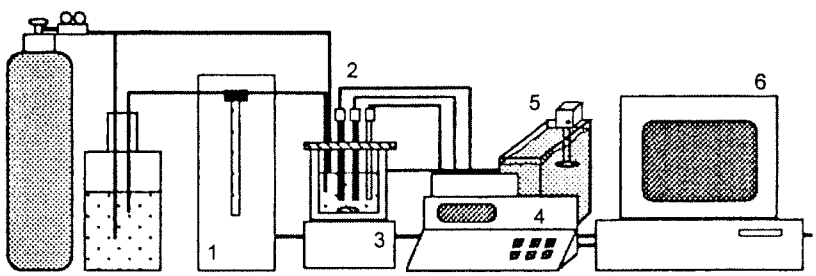


Figura 5.1 Esquema do sistema automático de titulação. 1-Bureta automática; 2-Sistema de eléctrodos; 3-Agitador magnético; 4-Decimilivoltímetro; 5-Banho termostatizado; 6-Microprocessador.

A calibração do sistema foi efectuada em função da concentração de catião hidrogénio, por titulação de uma solução padrão de ácido forte (HCl 0,001 M) com uma base forte (NaOH ≈ 0,02 M), à temperatura de 25 °C e em atmosfera de árgon, o que permite também a padronização da base. A força iónica foi ajustada a 0,1 M em NaCl, tal como é sugerido pelas "Recomendations for Measurements and presentation of Biochemical Equilibrium Data" publicadas pela Interunion Comission on Biothermodynamics (IUPAC, IUB e IUPAB) visto que a maior parte das reacções de equilíbrio com interesse prático, seja na área biológica ou

noutra (alimentar, ambiental, etc.) ocorrem na presença de uma determinada quantidade fixa de electrólitos inertes (Interunion Comission on Biothermodynamics, 1976).

Utilizou-se a seguinte célula:

Ag | AgCl, KCl_{sat} || NaCl (0,1 M) || NaCl (0,1 M), H^+ | Eléctrodo de vidro

sendo o potencial da célula dado pela equação:

$$E = k_1 + k_2 \log c_{H^+} + k_2 \log \gamma_{H^+} \tag{5.1}$$

em que o termo k_1 engloba o potencial do eléctrodo indicador, o potencial do eléctrodo de referência e o potencial de junção líquida, k_2 = 2,303 RT/F, em que *R* é a constante dos gases reais, *T* a temperatura absoluta e *F* a constante de Faraday. Visto que a força iónica está ajustada e a actividade está relacionada com a concentração através do coeficiente de actividade, γ, o termo $k_2 \log \gamma_{H^+}$ é constante e ter-se-á:

$$E = k_1' + k_2 \log c_{H^+} \tag{5.2}$$

com $k_1' = k_1 + k_2 \log \gamma_{H^+}$ (5.3)

Os volumes equivalentes foram calculados pelo método da segunda derivada (incluída no programa de controlo do sistema de calibração) e pelo método de Gran.

Na Tabela 5.4 encontram-se representados os valores obtidos, estando os respectivos diagramas de distribuição, efectuados com o programa HySS (Alderighi, L. *et al.*, 1999), representados na Figura 5.2. Relativamente ao clordiazepóxido, o valor da constante de acidez foi também determinado neste laboratório (Castro, B. *et al.*, 1993) enquanto os valores referentes à isoniazida e dibucaína provêm de resultados referenciados na literatura.

A grepafloxacina e a norfloxacina contêm dois grupos funcionais ionizáveis nomeadamente, o grupo 7-piperazina e o grupo 3-carboxílico (Dong-Sun L. *et al.*, 1994).

Relativamente à rifampicina, o pK_{a1} está relacionado com o grupo hidroxilo na posição 4 (ver estrutura da rifampicina) e o pK_{a2} com o azoto localizado na posição 3 do anel piperazínico (Foye, W.O., 1989), (Newton, W. e Kluza, R.B., 1978).

Tabela 5.4 Constantes de acidez dos fármacos[a].

	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a3}
Grepafloxacina	6,68 ± 0,06	8,33 ± 0,07	-
Norfloxacina	6,25 ± 0,01	8,44 ± 0,01	-
Rifampicina	3,33 ± 0,07	7,46 ± 0,06	-
Clordiazepóxido[b]	4,79 ± 0,03	-	-
Isoniazida [c]	2,13	3,81	11,03
Dibucaína [d]	1,77	8,85	-
Griseofulvina	-	-	-

[a] Os resultados obtidos são provenientes da média de pelo menos oito titulações independentes.[b] Castro, B. *et al.*, 1993. [c] Nagano, K. *et al.*, 1963, [d] Coutinho, A. *et al.*, 1990.

O clordiazepóxido apresenta protonação no átomo de oxigénio ligado ao azoto imínico N-4 ou seja, ao grupo N-óxido (Pfendt, L.B. *et al.*, 1990). A isoniazida tem três constantes de acidez estando a primeira relacionada com o azoto do grupo hidrazida, a segunda com o azoto do grupo pirimidínico e a terceira com o grupo cetónico (Nagano, K. *et al.*, 1963). Quanto à dibucaína o pK_{a1} relaciona-se com o N aromático e o pK_{a2} com a amina terciária (Coutinho, A. *et al.*, 1990).

A griseofulvina apresenta uma solubilidade em água muito reduzida, impossibilitando a execução de determinações potenciométricas. Procedeu-se então ao cálculo das constantes de acidez utilizando outra metodologia, nomeadamente a espectrofotometria de UV-Vis. No entanto, a análise dos espectros obtidos a diferentes pH (4-10) não revelou qualquer alteração espectral.

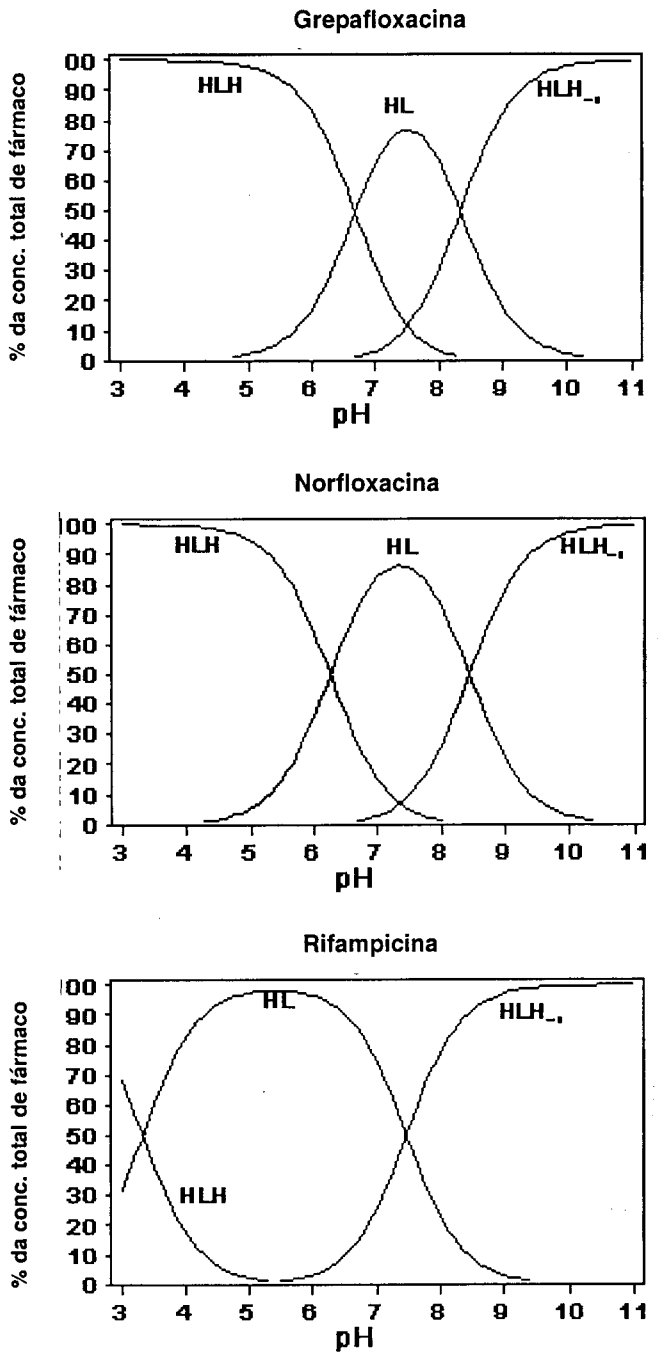


Figura 5.2 Diagramas de distribuição para a grepafloxacina, norfloxacina e rifampicina. Relativamente às fluoroquinolonas, HLH representa a forma protonada, HL a forma de ião dipolar e HLH^{-1} a forma negativa ou de anião. Quanto à rifampicina, HLH representa a forma protonada, HL a forma neutra e HLH^{-1} a forma negativa.

Capítulo 6 | DETERMINAÇÃO DOS COEFICIENTES DE PARTIÇÃO DOS FÁRMACOS UTILIZADOS ENTRE UMA SOLUÇÃO AQUOSA E VESÍCULAS LIPOSSÓMICAS

O estudo das interacções físico-químicas dos fármacos utilizados com vesículas lipossómicas de DMPC e DMPG inclui, necessariamente, o cálculo dos respectivos coeficientes de partição (K_p) entre o meio membranar das vesículas e o meio aquoso.

As determinações dos coeficientes de partição dos fármacos com vesículas de DMPC foram efectuadas utilizando dois métodos espectrofotométricos diferentes: um método que se baseia na espectrofotometria derivativa de UV-Vis, sem que seja necessário proceder à separação das fases lipídica e aquosa (Hepes), e um método que segue as metodologias clássicas de determinação de K_p, baseado na separação de fases, em que os coeficientes de partição são calculados directamente a partir da concentração dos fármacos nas soluções aquosas e nas soluções etanólicas, preparadas com vista à lise das vesículas fosfolipídicas, após a separação de fases.

Relativamente ao cálculo dos coeficientes de partição em vesículas de DMPG foi utilizado apenas o método da espectrofotometria derivativa de UV-Vis, visto que as tentativas levadas a cabo para proceder à separação de fases se mostraram infrutíferas.

Paralelamente, os coeficientes de partição de alguns fármacos foram também determinados por espectroscopia de fluorescência, de modo a garantir a exactidão dos resultados experimentais obtidos.

A escolha da concentração dos fármacos utilizada em cada ensaio efectuou-se após verificação da lei de Lambert-Beer para um intervalo de concentrações dos mesmos em solução aquosa (tampão Hepes), tanto para os ensaios de espectrofotometria de absorção e espectrofotometria derivativa como de espectrofluorimetria. Relativamente aos ensaios de espectrofotometria de UV-Vis, os intervalos de concentrações obtidas para cada um dos

fármacos estudados, aos comprimentos de onda máximos de absorção, são: 6,7-40,4 μM para o clordiazepóxido; 105,0-211,0 μM para a isoniazida; 8,7-41,8 μM para a rifampicina; 5,1-25,5 μM para a griseofulvina; 9,2-193,4 μM para a dibucaína; 5,52-27,6 μM para a grepafloxacina e 10,0-60,0 μM para a norfloxacina. Quanto aos ensaios de fluorescência foi verificada a lei de Lambert-Beer, ao comprimento de onda máximo de emissão, para os seguintes intervalos de concentrações: 0,96-9,64 μM para a grepafloxacina; 1,0-13,0 μM para a norfloxacina e 3,5-13,9 μM para a griseofulvina.

A introdução da dibucaína nestes ensaios deve-se ao facto de ser um fármaco cujos coeficientes de partição água/lipossomas se encontram descritos na literatura (Seelig, A. *et al.*, 1988), sendo utilizada essencialmente para validar as metodologias utilizadas e a qualidade dos resultados obtidos para os restantes fármacos.

1 Determinação dos coeficientes de partição recorrendo à espectrofotometria de UV-Vis

O reconhecimento do elevado poder de resolução da espectrofotometria derivativa tem conduzido à sua crescente utilização, com inúmeras vantagens na eliminação de interferências espectrais e resolução de bandas encobertas pertencentes a espectros largos e pouco diferenciados. (Kitamura K. e Imayoshi N., 1992), (Kitamura K. *et al.*, 1995), (Omran A.A. *et al.*, 2001), (Hackmann E. *et al.*, 1991).

As suspensões de lipossomas unilamelares de DMPC, preparadas pelo método descrito no capítulo 4 e utilizadas neste tipo de ensaios, apresentam uma coloração branco-azulada ténue e, embora mais translúcidas do que as suspensões de MLVs suas precursoras, causam igualmente dispersão da luz incidente durante o traçado dos espectros de absorção. A dispersão é tanto maior quanto mais concentrada for a suspensão e verifica-se ao longo de toda o intervalo de comprimentos de onda estudados. A espectrofotometria derivativa permite a eliminação parcial deste tipo de interferência mas não a sua supressão

total, como se pode observar na Figura 6.1. 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 comprimentos de onda menores (Braun R.D., 1987).

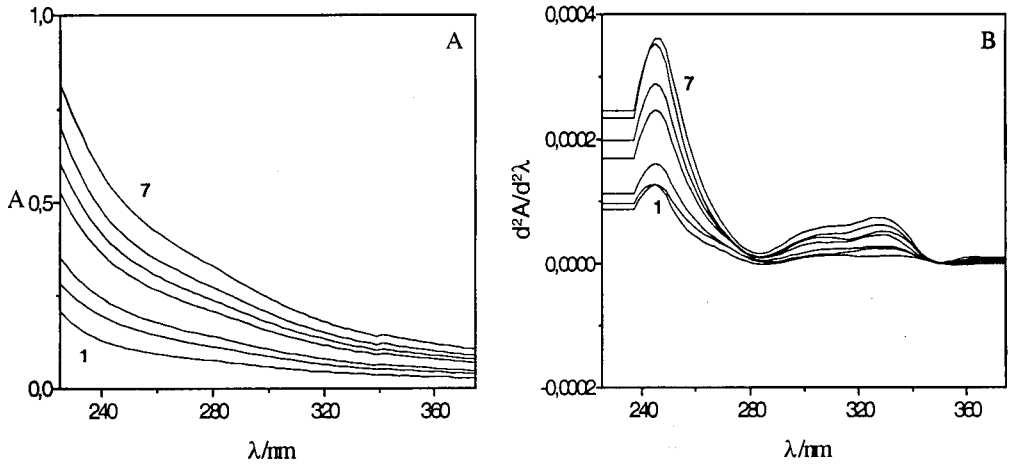


Figura 6.1 Espectros de absorção (A) e espectros de segunda derivada (B) de suspensões vesiculares de DMPC em tampão Hepes, de concentrações (μM): (1) 136, (2) 227, (3) 287, (4) 425, (5) 514, (6) 584 e (7) 714.

As vesículas unilamelares de DMPG originam suspensões mais translúcidas comparativamente às dispersões de DMPC de igual concentração, devido provavelmente às repulsões electrostáticas entre as vesículas carregadas negativamente (Riske, K.A. *et al.*, 1999). Assim sendo, os espectros de UV-Vis apresentam uma dispersão de luz menos acentuada, embora presente em toda o intervalo de comprimentos de onda utilizados (Figura 6.2).

Face ao exposto, os espectros de UV-Vis dos fármacos em estudo, na presença de concentrações crescentes de vesículas lipossómicas, apresentam acentuadas interferências espectrais (Figura 6.3).

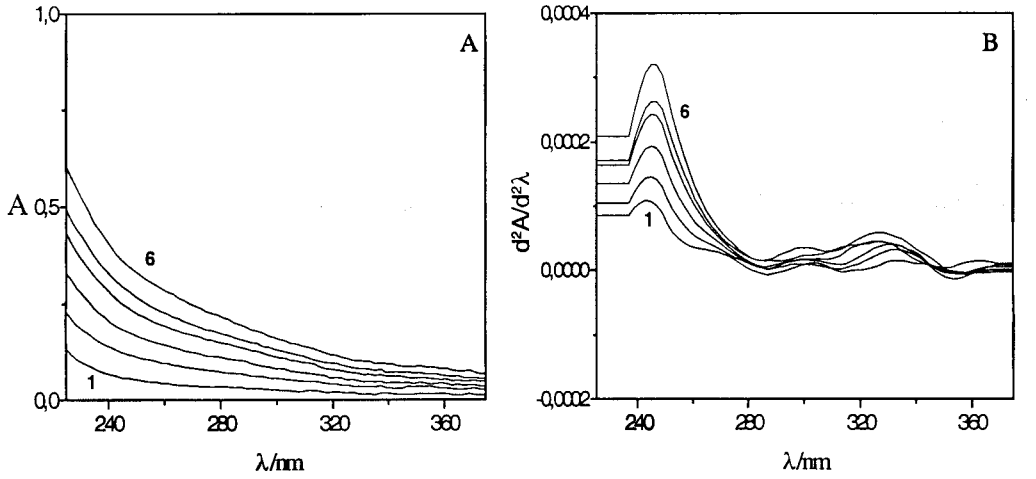


Figura 6.2 Espectros de absorção (A) e espectros de segunda derivada (B) de suspensões vesiculares de DMPG em tampão Hepes, de concentrações (μM): (1) 130, (2) 295, (3) 455, (4) 524, (5) 634 e (6) 762.

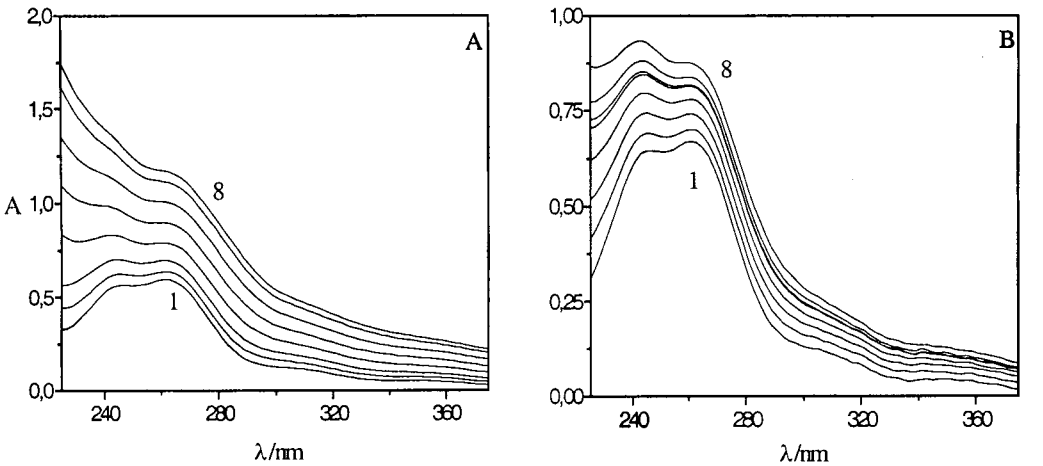


Figura 6.3 Espectros de absorção do clordiazepóxido (concentração 14,0 μM) na presença de (A) concentrações crescentes de LUVs de DMPC (μM): (1) 0; (2) 128; (3) 248; (4) 516; (5) 770; (6) 895; (7) 1035; (8) 1313 e de (B) concentrações crescentes de LUVs de DMPG (μM): 144; 305; 464; 634; 658; 761; 912.

A simples obtenção das derivadas dos espectros das amostras ou a subtracção das suspensões de referência, por si só, não permitem a eliminação absoluta da dispersão de luz interferente, apesar dos brancos serem preparados com as mesmas concentrações lipídicas. Deste modo, só as derivadas dos espectros de subtracção (espectros resultantes da subtracção dos espectros das amostras aos espectros dos brancos) permitem a anulação

satisfatória dos sinais de fundo e a observação de detalhes espectrais resultantes da interacção fármaco/lipossoma, como se pode observar pela análise da Figura 6.4.

Analisando os gráficos da primeira, segunda e terceira derivada dos espectros de subtracção é possível verificar que a primeira derivada permite apenas a eliminação parcial das interferências causadas pelas vesículas lipossómicas, enquanto a segunda e terceira derivadas anulam totalmente os fenómenos de dispersão de luz. Deste modo, foram utilizados os espectros de segunda derivada para o cálculo dos coeficientes de partição dos fármacos entre as vesículas lipossómicas e a solução aquosa de tampão Hepes, embora pontualmente se tenham efectuado determinações a partir dos dados dos espectros de primeira e terceira derivadas.

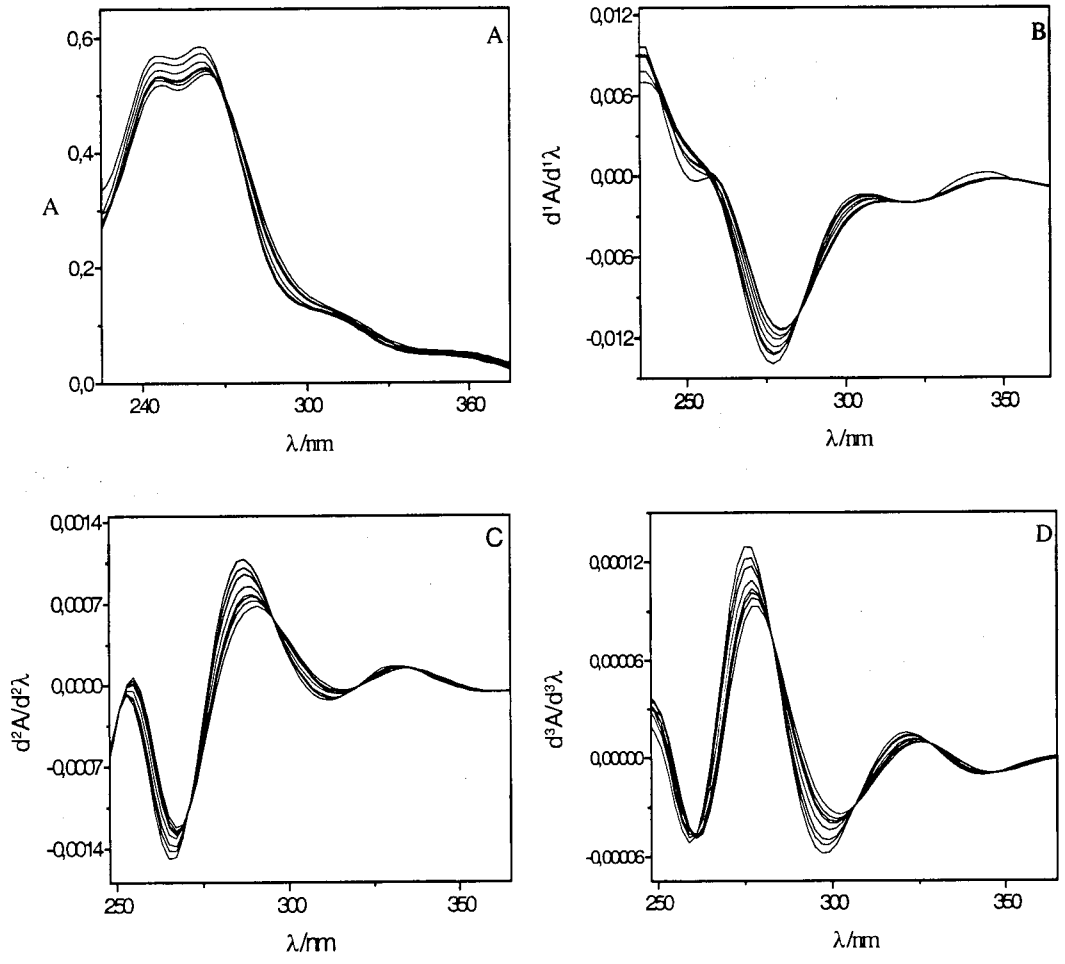


Figura 6.4 Espectros de subtracção do clordiazepóxido de ordem zero (A), de primeira derivada (B), de segunda derivada (C) e de terceira derivada (D).

Estudou-se igualmente o efeito da concentração dos fármacos no cálculo dos valores dos coeficientes de partição, efectuando ensaios para duas concentrações diferentes de cada um deles, bem como o efeito do tempo de incubação, fazendo leituras após 30 minutos, 120 minutos e 24 horas, tendo sido possível concluir não existir qualquer alteração dos valores de K_p.

1.1 Determinação dos coeficientes de partição em LUVs de DMPC

Espectros de ordem zero. Nas Figuras 6.5, 6.6 e 6.7 estão representados os espectros de subtracção dos fármacos estudados na presença de concentrações crescentes de LUVs de DMPC. A análise destes espectros revela, como se referiu, a presença de dispersão de luz que não foi totalmente contrabalançada após a subtracção dos brancos. Este problema é particularmente importante a comprimentos de onda menores, para os quais a dispersão de luz é maior.

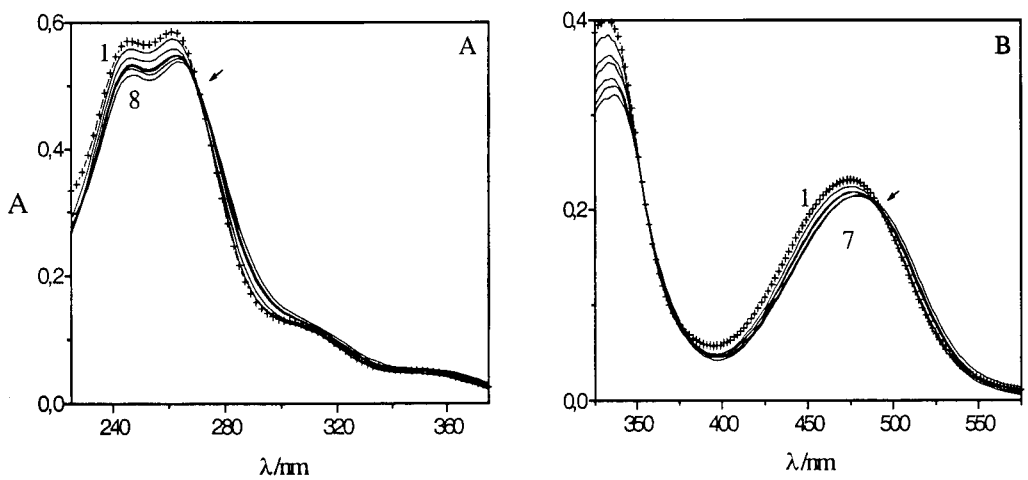


Figura 6.5 Espectros de absorção do (**A**) clordiazepóxido (13,5 μM) e (**B**) rifampicina (22,3 μM), obtidos na ausência (1) e na presença de concentrações crescentes de DMPC (2-7 ou 2-8); concentrações de DMPC (μM): (A) 128; 248; 516; 770; 895; 1035; 1313. (B) 138; 266; 410; 542; 702; 849. Os espectros dos fármacos obtidos na ausência de lípido estão assinalados com os símbolos (++) de modo a facilitar a visualização dos pontos isosbésticos.

Em todos os espectros é possível observar, no intervalo de comprimentos de onda até aos pontos isosbésticos, a diminuição da intensidade de absorção à medida que aumenta a concentração em DMPC, indicativo de que o valor de ε dos fármacos na membrana é inferior ao valor de ε na solução aquosa. Para além deste aspecto geral, os fármacos podem ser reunidos em grupos de acordo com as alterações espectrais observadas com o aumento da concentração lipídica.

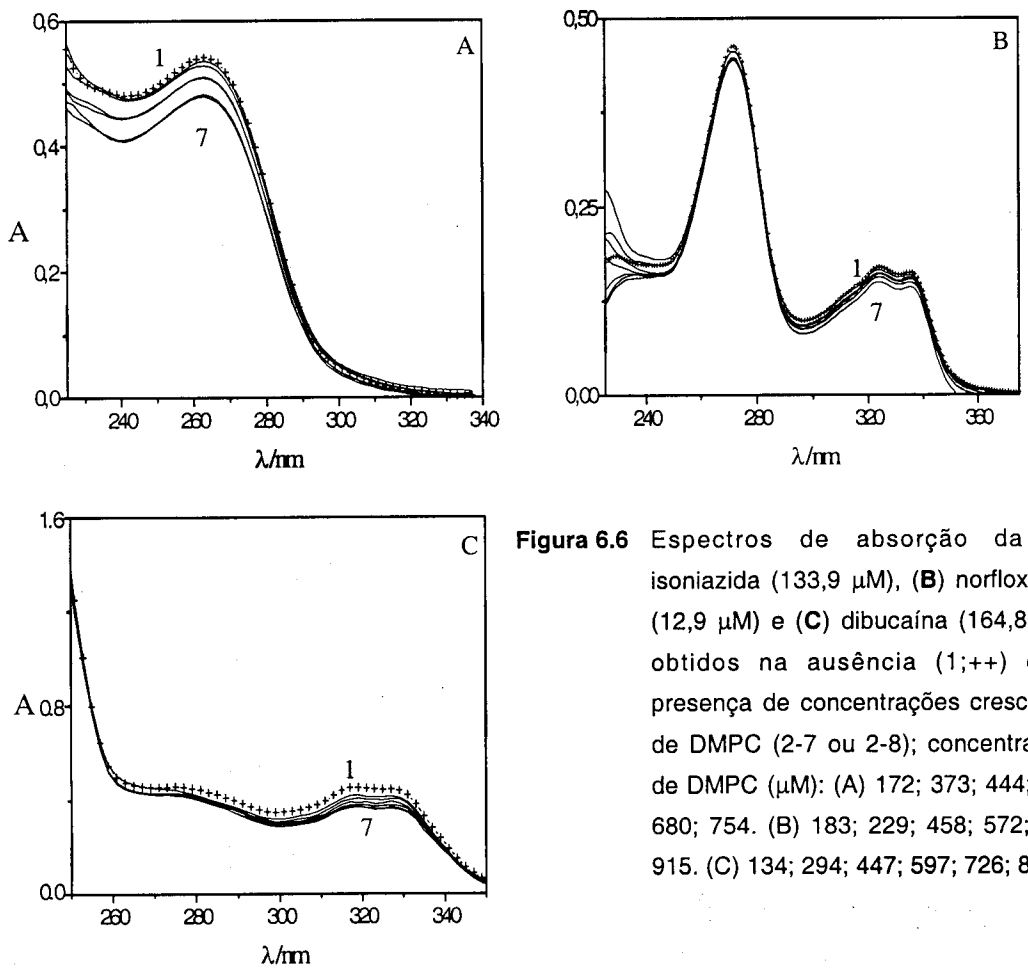


Figura 6.6 Espectros de absorção da (**A**) isoniazida (133,9 μM), (**B**) norfloxacina (12,9 μM) e (**C**) dibucaína (164,8 μM), obtidos na ausência (1;++) e na presença de concentrações crescentes de DMPC (2-7 ou 2-8); concentrações de DMPC (μM): (A) 172; 373; 444; 572; 680; 754. (B) 183; 229; 458; 572; 686; 915. (C) 134; 294; 447; 597; 726; 867.

Os espectros de absorção do clordiazepóxido e da rifampicina exibem um deslocamento batocrómico das bandas de absorção e uma diminuição da intensidade máxima das mesmas à medida que aumenta a concentração em DMPC. Podemos também realçar a existência de

um ponto isosbéstico a 270 nm nos espectros do clordiazepóxido e a 490 nm nos da rifampicina, o que indica claramente a presença destes fármacos em pelo menos duas formas diferentes: forma livre, na fase aquosa polar e uma forma ligada às membranas lipídicas (Kitamura K. e Imayoshi N., 1992), (Kitamura K. *et al.*, 1995), (Connors K. A., 1987).

Deve referir-se igualmente o facto dos espectros de absorção do clordiazepóxido a comprimentos de onda inferiores a 250 nm não apresentarem uma diminuição regular com o aumento da concentração lipídica, o que sugere uma eliminação incompleta da dispersão de luz nesta zona espectral. Também a diferença entre o máximo de absorção dos fármacos livres em solução e inseridos na bicamada não é suficientemente grande para permitir a resolução das bandas correspondentes à absorção dos fármacos nos dois ambientes distintos, observando-se uma banda única cujo máximo se vai deslocando à medida que a concentração da espécie na membrana aumenta (Welti R. *et al.*, 1984).

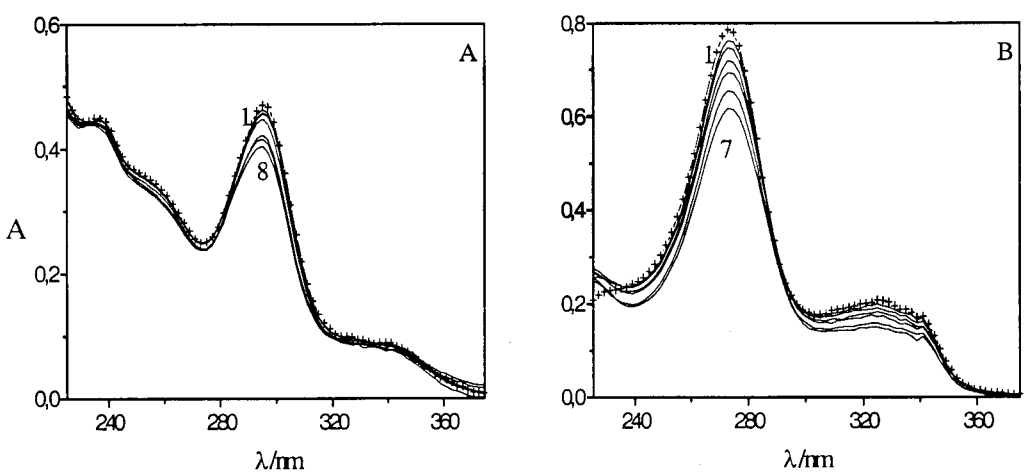


Figura 6.7 Espectros de absorção da (**A**) griseofulvina (24,8 μM) e (**B**) grepafloxacina (23,0 μM), obtidos na ausência (1;++) e na presença de concentrações crescentes de DMPC (2-7 ou 2-8); concentrações de DMPC (μM): (A) 91; 138; 231; 470; 743; 880; 1020. (B) 176; 387; 580; 776; 978; 1122.

O segundo grupo de fármacos compreende a isoniazida, a norfloxacina e a dibucaína. A análise dos espectros revela apenas uma diminuição mais ou menos acentuada da intensidade de absorção à medida que aumenta a concentração em DMPC, sem que ocorra

qualquer desvio dos comprimentos de onda máximos e sendo os espectros dos fármacos na presença dos lípidos praticamente idênticos aos espectros traçados na sua ausência. Finalmente, o terceiro grupo de fármacos engloba a griseofulvina e a grepafloxacina, cujos espectros apresentam um ligeiro desvio dos $\lambda_{máx}$, mas que é, no entanto, insuficiente para que ocorram pontos isosbésticos nos espectros. Evidencia-se também a existência de dispersão de luz, que é notoriamente superior a comprimentos de onda menores.

Para cada um dos fármacos traçaram-se os espectros de primeira, segunda e terceira derivadas. Como já foi referido anteriormente, a primeira derivada nem sempre permite a eliminação total da dispersão de luz, sendo as determinações dos coeficientes de partição efectuados geralmente a partir dos espectros de segunda derivada.

Espectros de segunda derivada. Os espectros de segunda derivada obtidos a partir dos espectros de absorção dos fármacos estão representados nas Figuras 7.8, 7.9 e 7.10. Nestes podem ser observadas as mesmas características espectrais dos espectros de ordem zero mas de forma mais pronunciada, visto que o processo de derivação permite o aumento da resolução das bandas parcialmente encobertas, com supressão das bandas largas e realce das bandas estreitas. A presença de pontos nulos bem definidos nos espectros de todos os fármacos indica a eliminação total dos efeitos relativos à dispersão de luz residual (Hackmann E. *et al.*, 1991), (Omran A. A. *et al.*, 2001).

Nos espectros de segunda derivada do clordiazepóxido e da rifampicina, de forma similar à observada nos espectros de absorção, ocorre um deslocamento do $\lambda_{máx}$ para maiores comprimentos de onda, o que é característico da passagem dos fármacos para ambientes de menor polaridade, com diminuição da intensidade das bandas à medida que aumenta a concentração de lípido (Nassar, P.M. *et al.*, 1998). Apresentam também pontos isosbésticos bem definidos a 270 nm, 295 nm e 334 nm no caso do clordiazepóxido e pontos a 380 nm, 490 nm e 530 nm no caso da rifampicina.

Relativamente aos espectros de segunda derivada da isoniazida, norfloxacina e dibucaína ocorre apenas uma diminuição da intensidade das bandas, sem qualquer desvio dos $\lambda_{máx}$, sendo os espectros obtidos em meio lipossómico praticamente idênticos aos espectros traçados em meio aquoso.

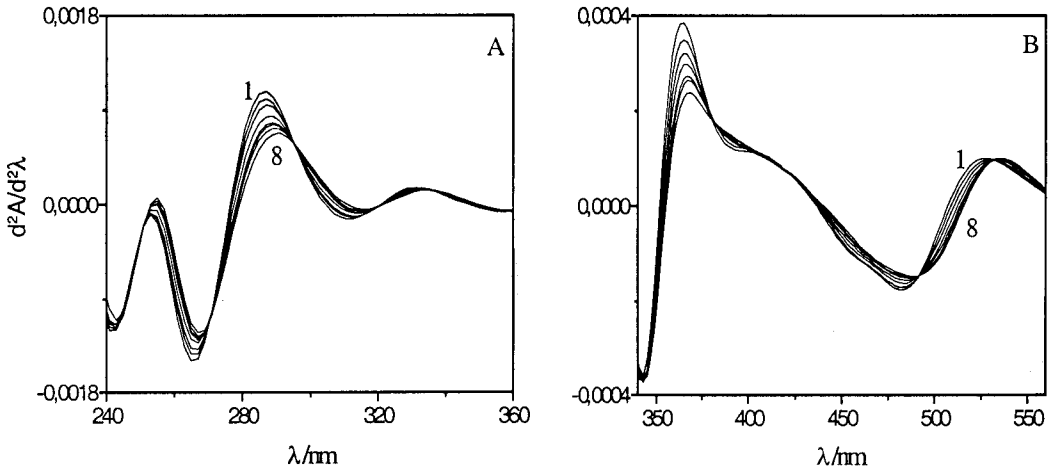


Figura 6.8 Segunda derivada dos espectros de absorção do clordiazepóxido (A) e da rifampicina (B) obtidos na ausência (1) e na presença de concentrações crescentes de DMPC (2-7). Ver concentrações na Figura 6.5.

No caso da griseofulvina e da grepafloxacina, para além da diminuição da intensidade das bandas, podem observar-se pontos isosbésticos nos espectros de segunda derivada a 286 nm e 311 nm no caso da griseofulvina e a 282 nm e 308 nm no caso da grepafloxacina, com um ligeiro desvio batocrómico dos comprimentos de onda máximos. Tal facto permite supor a existência de uma segunda forma espectral dos fármacos, pouco detectável nos espectros de ordem zero, que corresponde à forma ligada, ainda que esta exista em concentrações muito reduzidas, como o atestam os valores dos coeficientes de partição calculados.

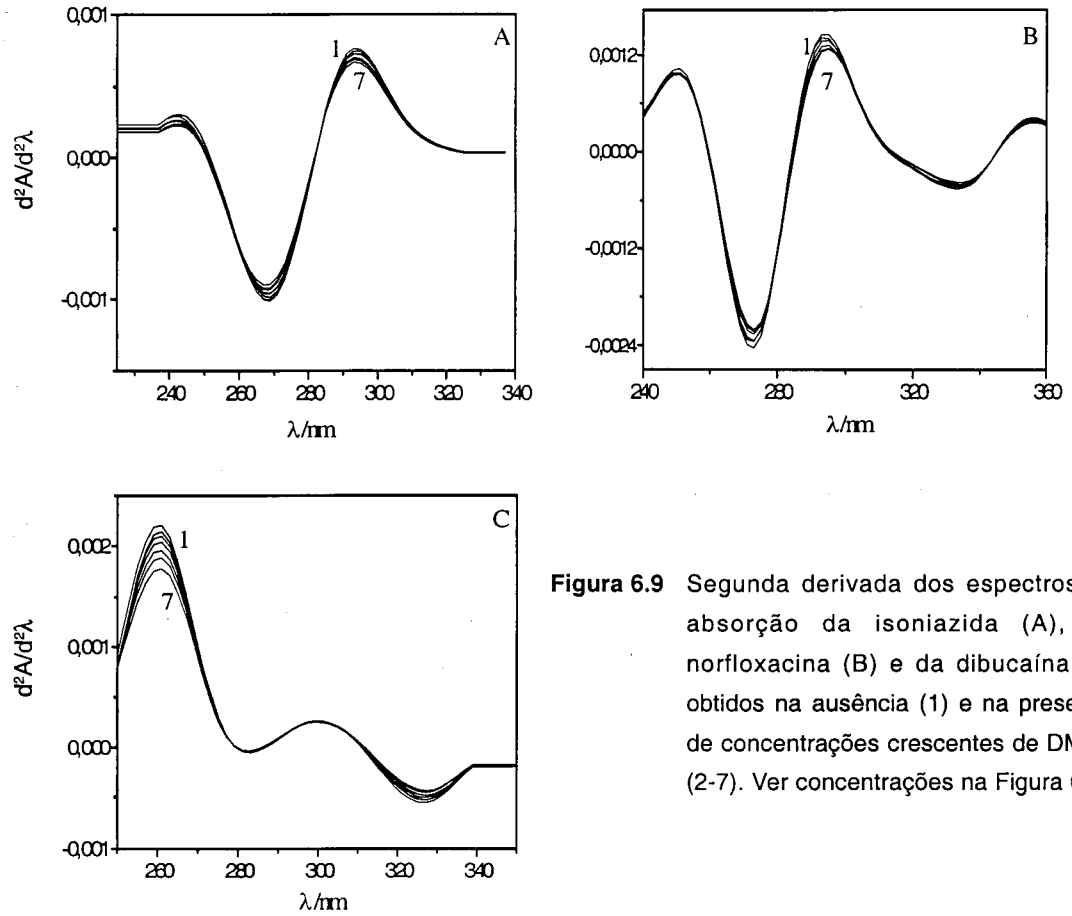


Figura 6.9 Segunda derivada dos espectros de absorção da isoniazida (A), da norfloxacina (B) e da dibucaína (C) obtidos na ausência (1) e na presença de concentrações crescentes de DMPC (2-7). Ver concentrações na Figura 6.6.

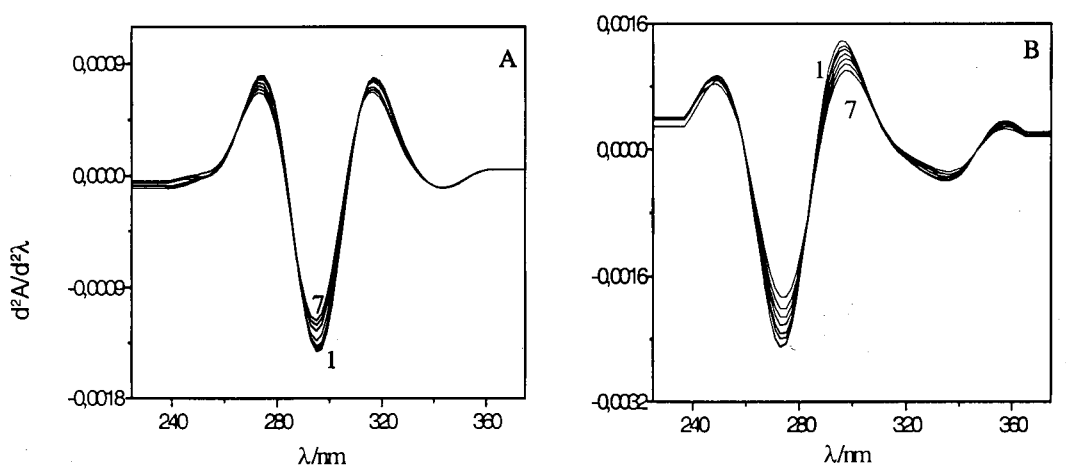


Figura 6.10 Segunda derivada dos espectros de absorção da griseofulvina (A) e da grepafloxacina (B) obtidos na ausência (1) e na presença de concentrações crescentes de DMPC (2-7). Ver concentrações na Figura 6.7.

Cálculo dos coeficientes de partição (K_p)

O cálculo dos coeficientes de partição dos fármacos (K_p) efectuou-se por ajuste da equação (3.6) aos dados experimentais (ΔD versus [L]), através de uma regressão não linear. Os valores de ΔD resultam da diferença entre os valores das derivadas dos espectros dos fármacos na ausência e na presença de concentrações crescentes de lípido [L], a um determinado comprimento de onda. A curva ΔD versus [L] tem uma forma hiperbólica, (ver Figura 6.11A) tendendo para um mínimo ou máximo de acordo com o comprimento de onda escolhido, e que corresponde à absorvância das suspensões quando é atingido um estado de saturação membranar pelos fármacos se encontram ligados. Aplicou-se igualmente o método dos recíprocos duplos, por ajuste da equação (3.7) aos dados experimentais (Figura 6.10B).

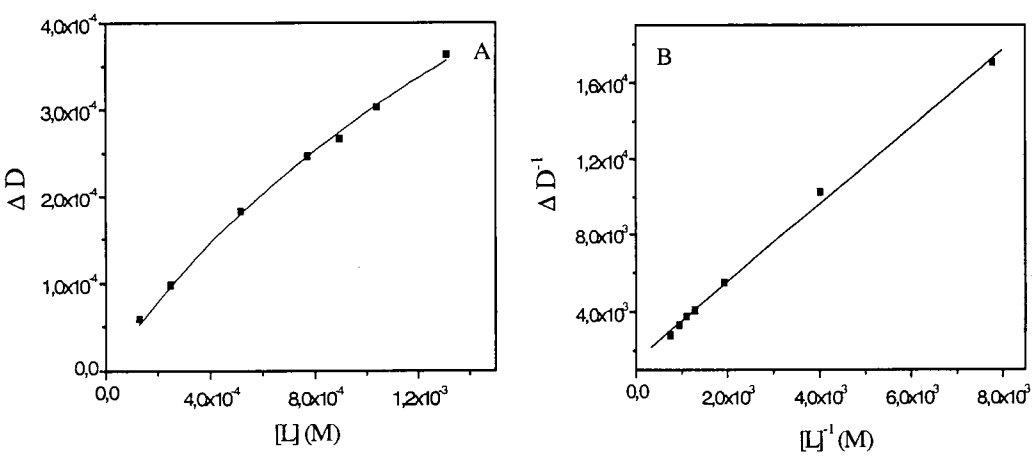


Figura 6.11 Ajuste das equações (3.6 e 3.7) aos dados experimentais obtidos. Método de regressão não linear (A) e método dos recíprocos duplos (B). Valores relativos à segunda derivada dos espectros do clordiazepóxido a 289 nm.

Teoricamente os valores de K_p podem ser calculados a partir dos valores de ΔD a qualquer comprimento de onda. No entanto, de modo a aumentar a razão sinal/ruído os valores de ΔD para amostras heterogéneas deverão ser obtidos para os valores de $\lambda_{máx}$ dos espectros de absorção (Kitamura K., *et al.*, 1995), (Kitamura K. e Imayoshi N., 1992), (Talsky G. *et al.*, 1978), dado que na vizinhança dos máximos de absorção pequenas incorrecções na reprodutibilidade dos comprimentos de onda não implicam grandes alterações nos

valores de ΔD (Kitamura K. e Imayoshi N., 1992). Outra precaução consiste na garantia da ausência total de dispersão de luz, especialmente para valores pequenos de comprimentos de onda, quando a dispersão é elevada.

Os valores dos $\lambda_{máx}$ dos espectros de absorção e dos $\lambda_{máx}$ e λ_{min} dos respectivos espectros de segunda derivada utilizados no cálculo dos valores de K_p dos fármacos encontram-se representados na Tabela 6.1.

Tabela 6.1 Valores dos comprimentos de onda máximos,$\lambda_{máx}$ (nm), dos espectros de absorção e dos comprimentos de onda máximos,$\lambda_{máx}$ (nm), e mínimos, λ_{min} (nm), dos espectros de segunda derivada dos fármacos.

	Espectros de absorção		***Espectros de segunda derivada***			
	$\lambda_{máx1}$	$\lambda_{máx2}$	λ_{min1}	λ_{min2}	$\lambda_{máx1}$	$\lambda_{máx1}$
Clordiazepóxido	261	310	267	311	289	330
Rifampicina	475	-	483	-	527	-
Isoniazida	263	-	270	-	293	-
Norfloxacina	272	324	273	-	-	-
Dibucaína	323	-	327	-	261	-
Griseofulvina	295	-	296	-	275	317
Grepafloxacina	273	325	273	-	297	-

O cálculo dos coeficientes de partição dos fármacos efectuou-se a partir dos valores de λ_{min} e $\lambda_{máx}$ dos espectros de segunda derivada. A utilização de dados relativos a dois ou mais comprimentos de onda diferentes permite, por si só, a verificação da eliminação efectiva dos fenómenos de dispersão de luz, bem como a avaliação da reprodutibilidade dos resultados.

Na Tabela 6.2 estão representados os valores dos coeficientes de partição dos fármacos, entre a fase aquosa e a fase lipídica membranar de DMPC, determinados pelo método de regressão não linear. Os valores resultam da média de pelo menos três ensaios independentes.

Tabela 6.2 Coeficientes de partição do clordiazepóxido, rifampicina, isoniazida, norfloxacina, dibucaina, griseofulvina e grepafloxacina em DMPC.

Coeficientes de partição (K_p / 10^4)[a]						
Clordiazepóxido	Rifampicina	Isoniazida	Norfloxacina	Dibucaína	Griseofulvina	Grepafloxacina
2,40 ± 0,30	5,09 ± 0,52	0,84 ± 0,12	0,20 ± 0,01	1,48 ± 0,09	1,74 ± 0,13	1,45 ± 0,08

[a] Os resultados correspondem à média e respectivo desvio padrão de pelo menos três ensaios independentes.

Os valores de K_p foram, em alguns casos, determinados a partir dos espectros de primeira e terceira derivadas e eram idênticos, a menos do erro experimental, dos valores calculados a partir dos espectros de segunda derivada e, tal como seria de esperar pela análise dos espectros dos fármacos, notoriamente maiores para o clordiazepóxido e rifampicina.

1.2 Determinação dos coeficientes de partição em LUVs de DMPG

Espectros de ordem zero. Os espectros de ordem zero dos fármacos traçados na presença de concentrações crescentes de DMPG e obtidos após subtracção das suspensões de referência estão representados nas Figuras 6.12, 6.13 e 6.14. A sua análise revela a existência de dispersão de luz para pequenos comprimentos de onda e uma diminuição da intensidade de absorção dos fármacos à medida que aumenta a concentração lipídica.

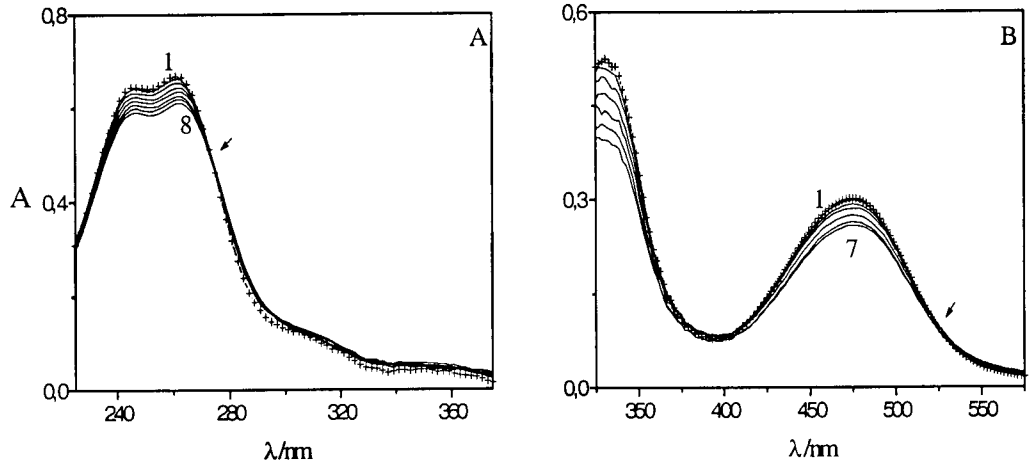


Figura 6.12 Espectros de absorção do (A) clordiazepóxido (15,6 μM) e da (B) rifampicina (30,0 μM) obtidos na ausência (1; ++) e na presença de concentrações crescentes de DMPG (2-8 e 2-7); DMPG (μM): (A) 143; 305; 464; 634; 658; 761; 912. (B) 95; 200; 299; 405; 572; 707.

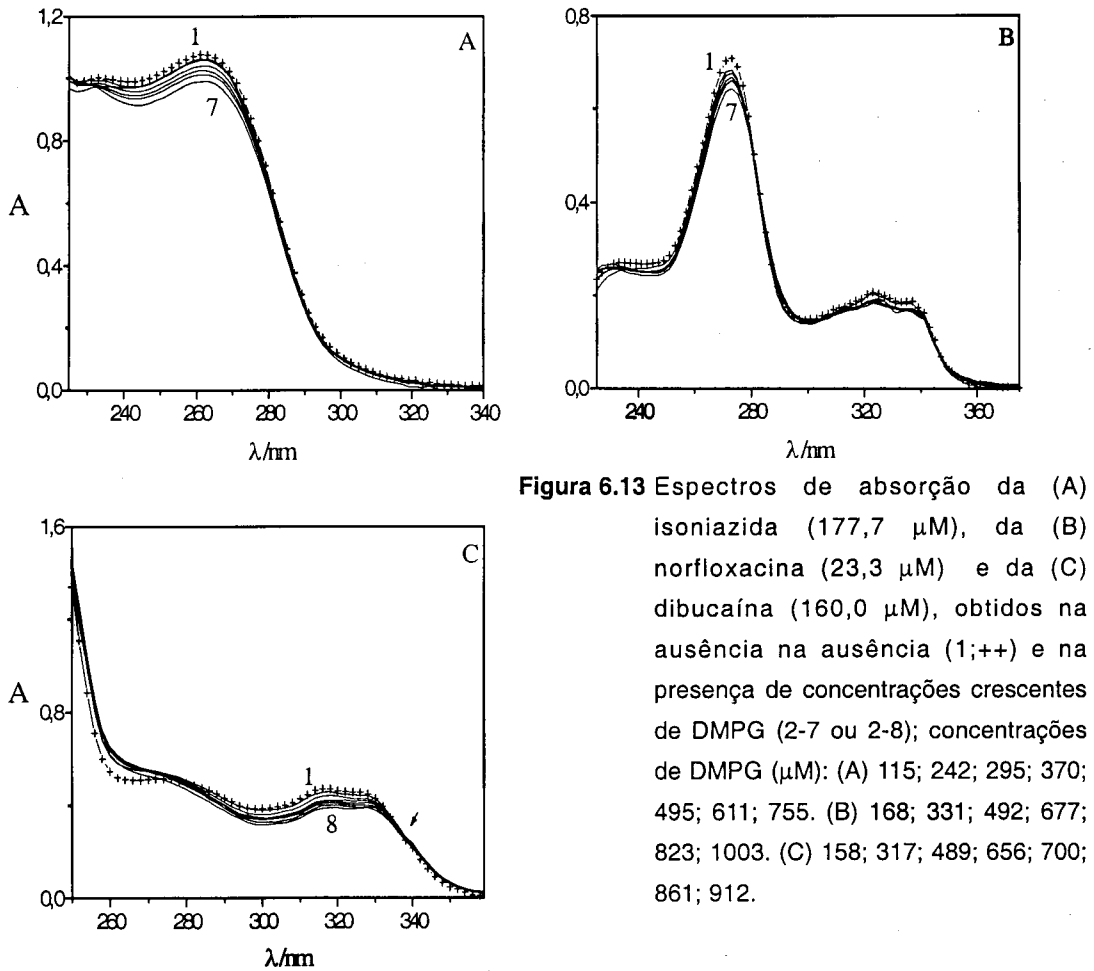


Figura 6.13 Espectros de absorção da (A) isoniazida (177,7 μM), da (B) norfloxacina (23,3 μM) e da (C) dibucaína (160,0 μM), obtidos na ausência na ausência (1;++) e na presença de concentrações crescentes de DMPG (2-7 ou 2-8); concentrações de DMPG (μM): (A) 115; 242; 295; 370; 495; 611; 755. (B) 168; 331; 492; 677; 823; 1003. (C) 158; 317; 489; 656; 700; 861; 912.

Também nestes ensaios é possível a separação dos fármacos em dois grupos distintos de acordo com as características espectrais por eles apresentadas na presença do lípido.

O primeiro grupo de fármacos compreende o clordiazepóxido, a rifampicina, a dibucaína, a griseofulvina e a grepafloxacina, cujos espectros de ordem zero exibem pontos isosbésticos bem definidos a 275 nm, 527 nm, 340 nm, a 305 nm e 277 nm, respectivamente, bem como desvios batocrómicos dos $\lambda_{máx}$, indicando a existência dos fármacos em duas formas espectralmente distintas (Connors K. A., 1987).

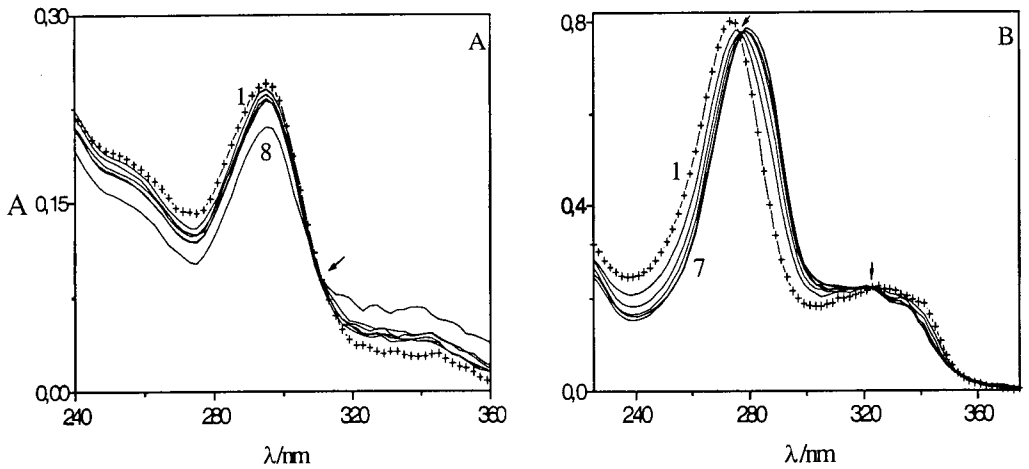


Figura 6.14 Espectros de absorção da (A) griseofulvina (13,9 μM) e da (B) grepafloxacina (22,9 μM), obtidos na ausência (1;++) e na presença de concentrações crescentes de DMPG (2-8 ou 2-7); concentrações de DMPG (μM): (A) 99; 199; 249; 312; 405; 609; 811. (B) 155; 304; 464; 622; 764; 926.

A isoniazida e a norfloxacina constituem o segundo grupo de fármacos. A análise dos seus espectros revela a inexistência de pontos isosbésticos característicos de sistemas contendo mais do que uma espécie em solução, podendo observar-se apenas uma diminuição da intensidade de absorção com o aumento da concentração lipídica de DMPG.

Espectros de segunda derivada. Tal como nos ensaios com DMPC, a segunda derivada dos espectros de absorção permite a eliminação satisfatória das interferências causadas pelas vesículas lipossómicas, como o atestam os pontos nulos bem definidos em todos os espectros, e a observação de detalhes espectrais característicos da interacção fármaco/lípido (ver Figuras 6.15, 6.16 e 6.17).

Os espectros de segunda derivada do clordiazepóxido apresentam pontos isosbésticos a 271 nm e a 299 nm, com um pequeno deslocamento de 2 nm do $\lambda_{máx}$ para maiores comprimentos de onda. Os espectros de segunda derivada da rifampicina e da dibucaína apresentam pontos isosbésticos a 501 nm e a 332 nm, respectivamente, com deslocamentos dos $\lambda_{máx}$ pouco acentuados.

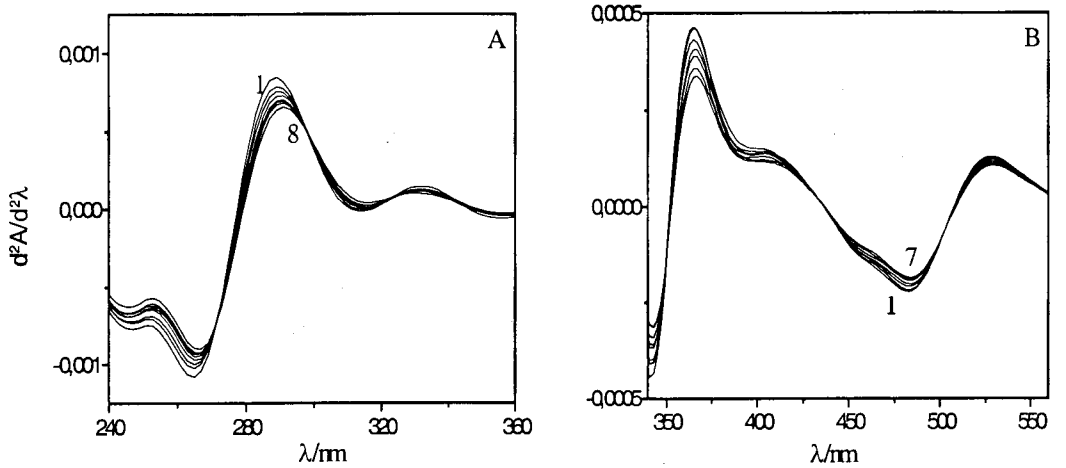


Figura 6.15 Segunda derivada dos espectros de absorção do clordiazepóxido (A) e da rifampicina (B) obtidos na ausência (1) e na presença de concentrações crescentes de DMPG (2-7). Ver concentrações na Figura 6.12.

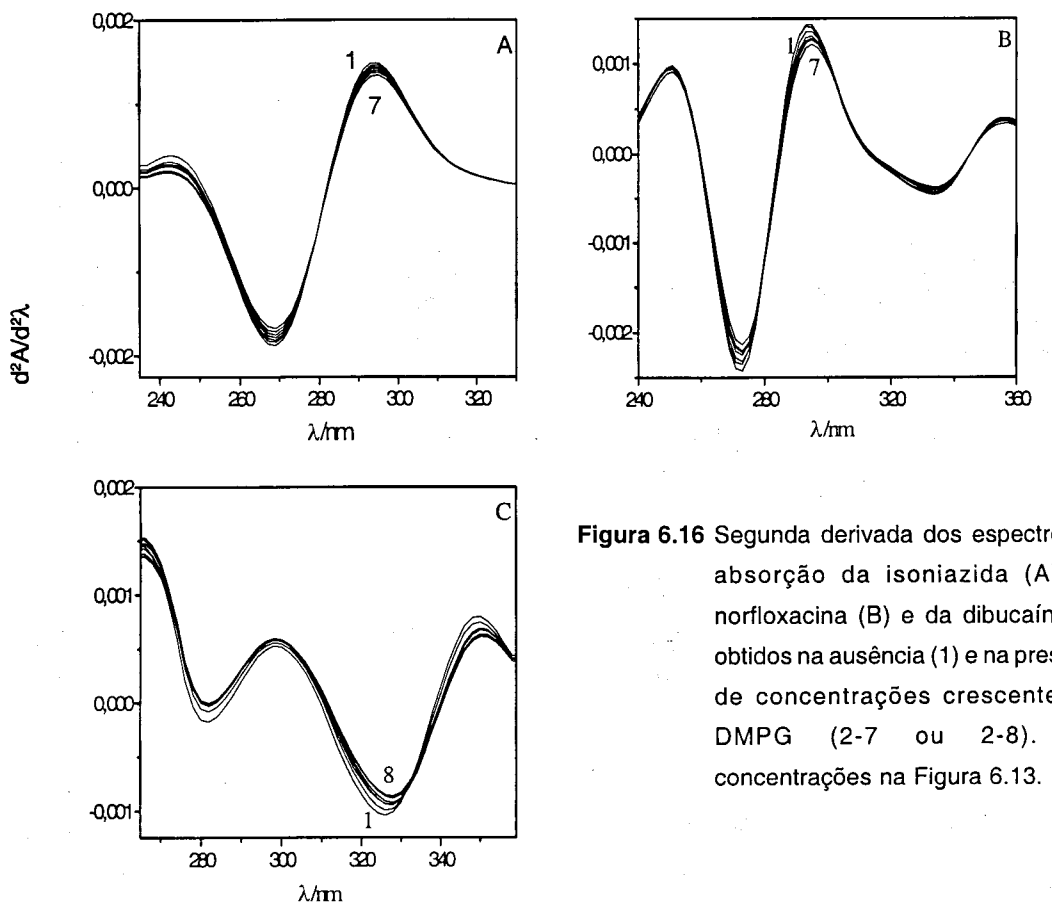


Figura 6.16 Segunda derivada dos espectros de absorção da isoniazida (A), da norfloxacina (B) e da dibucaína (C) obtidos na ausência (1) e na presença de concentrações crescentes de DMPG (2-7 ou 2-8). Ver concentrações na Figura 6.13.

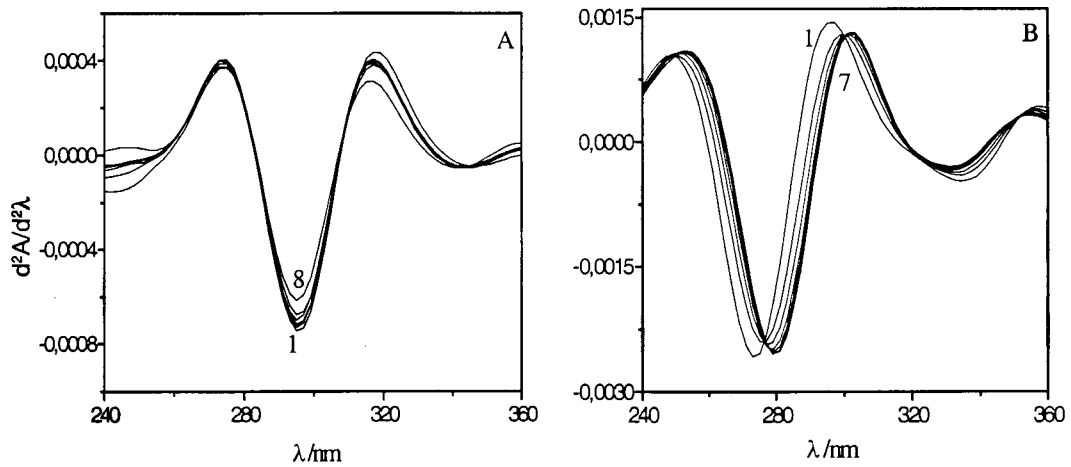


Figura 6.17 Segunda derivada dos espectros de absorção da griseofulvina (A) e da grepafloxacina (B) obtidos na ausência (1) e na presença de concentrações crescentes de DMPC (2-7 ou 2-8). Ver concentrações na Figura 6.14.

Relativamente aos espectros da griseofulvina, pode observar-se um ponto isosbéstico a 309 nm e um deslocamento do $\lambda_{máx}$ também de 2 nm. Finalmente, a grepafloxacina apresenta um desvio marcado dos comprimentos de onda máximos para uma zona de menor energia (deslocamento de 6 nm) com pontos isosbésticos bem definidos a 277 nm, 299 nm e 353 nm.

Os espectros de segunda derivada da isoniazida e da norfloxacina não apresentam pontos isosbésticos nem deslocamentos dos $\lambda_{máx}$, podendo observar-se apenas uma diminuição da intensidade das bandas à medida que aumenta a concentração de DMPG.

Cálculo dos coeficientes de partição (K_p)

Os coeficientes de partição dos fármacos em DMPG foram calculados utilizando o mesmo modelo matemático descrito para o DMPC, por ajuste das equações (3.6) e (3.7) aos dados experimentais obtidos. Na Figura 6.18 podem observar-se, a título exemplificativo, os ajustes não linear (A) e linear (B) dos dados experimentais relativos à grepafloxacina.

Os coeficientes de partição dos fármacos foram calculados a partir dos valores de ΔD obtidos aos comprimentos de onda máximos dos espectros de absorção, onde a razão sinal/ ruído é maior. Os $\lambda_{máx}$ dos espectros de absorção e os $\lambda_{máx}$ e λ_{min} dos respectivos espectros de segunda derivada utilizados na determinação dos K_p estão representados na Tabela 6.3.

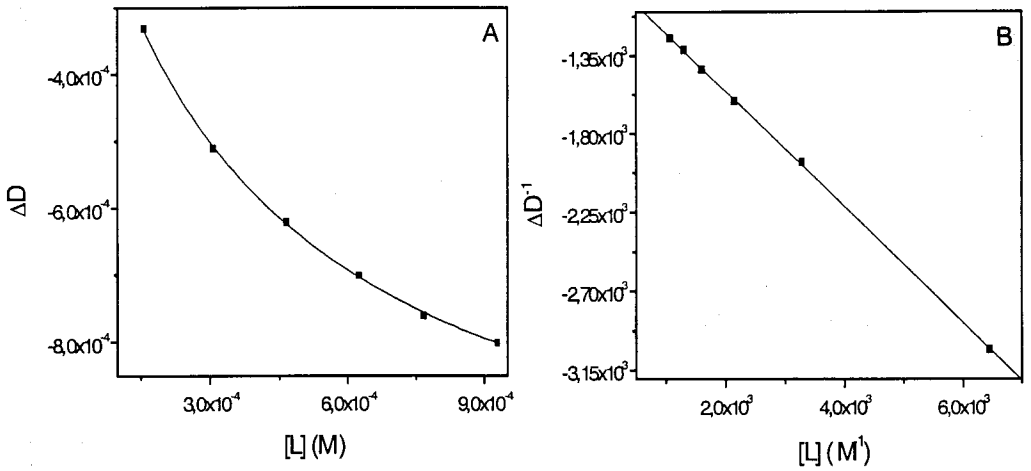


Figura 6.18 Ajuste das equações (3.6 e 3.7) aos dados experimentais obtidos. Método de regressão não linear (A) e método dos recíprocos duplos (B). Valores relativos à segunda derivada dos espectros da grepafloxacina a 273 nm.

Efectuaram-se também cálculos a partir dos espectros de primeira e terceira derivadas, tendo-se obtido resultados concordantes, que vêm comprovar a eliminação total da dispersão de luz causada pelas vesículas.

Tabela 6.3 Valores dos comprimentos de onda máximos, $\lambda_{máx}$ (nm), dos espectros de absorção e dos comprimentos de onda máximos, $\lambda_{máx}$ (nm), e mínimos, λ_{min} (nm), dos espectros de segunda derivada dos fármacos.

	Espectros de absorção		***Espectros de segunda derivada***	
	$\lambda_{máx1}$	$\lambda_{máx2}$	λ_{min}	$\lambda_{máx}$
Clordiazepóxido	261	310	265	289
Rifampicina	475	-	483	527
Isoniazida	263	-	-	293
Norfloxacina	272	324	273	293
Dibucaína	323	-	326	348
Griseofulvina	295	-	295	317
Grepafloxacina	273	325	273	295

Na Tabela 6.4 apresentam-se os valores dos coeficientes de partição dos fármacos, entre a fase aquosa e a fase lipídica membranar de DMPG, determinados pelo método de regressão não linear. Os referidos valores resultam da média de pelo menos três ensaios independentes.

Tabela 6.4 Coeficientes de partição do clordiazepóxido, rifampicina, isoniazida, norfloxacina, dibucaína, griseofulvina e grepafloxacina em DMPG.

Coeficientes de partição (K_p / 10^4)[a]						
Clordiazepóxido	Rifampicina	Isoniazida	Norfloxacina	Dibucaína	Griseofulvina	Grepafloxacina
2,56 ± 0,18	0,54 ± 0,25	0,59 ± 0,12	1,22 ± 0,25	6,68 ± 0,62	6,69 ± 0,90	14,89 ± 0,17

[a] Os resultados correspondem à média e respectivo desvio padrão de pelo menos três ensaios independentes.

Uma análise global destes parâmetros mostra que os valores de K_p obtidos em DMPG e em DMPC para o clordiazepóxido e isoniazida são praticamente independentes do tipo de lípido em estudo. Relativamente à rifampicina, o K_p é menor em DMPG e, por outro lado, a norfloxacina, a dibucaína, a griseofulvina e a grepafloxacina apresentam valores de K_p superiores em DMPG.

2 Determinação dos coeficientes de partição por espectroscopia de fluorescência

Paralelamente à determinação dos coeficientes de partição por espectrofotometria derivativa de UV-Vis, realizaram-se também ensaios por espectrofluorimetria para os fármacos detentores de propriedades fluorescentes, nomeadamente: a norfloxacina, a grepafloxacina e a griseofulvina.

Os espectros de emissão de fluorescência foram traçados após excitação ao $\lambda_{máx}$ de absorção dos fármacos (330 nm para a grepafloxacina, 320 nm para a norfloxacina e 295 nm para a griseofulvina) de forma a minimizar os fenómenos de dispersão de luz. Nestas

condições, a interferência espectral provocada pelas vesículas unilamelares de DMPC e DMPG é bastante reduzida, como se pode observar na Figura 6.19, sendo totalmente eliminada após a subtracção das suspensões de referência, pelo que é desnecessária a derivação dos espectros.

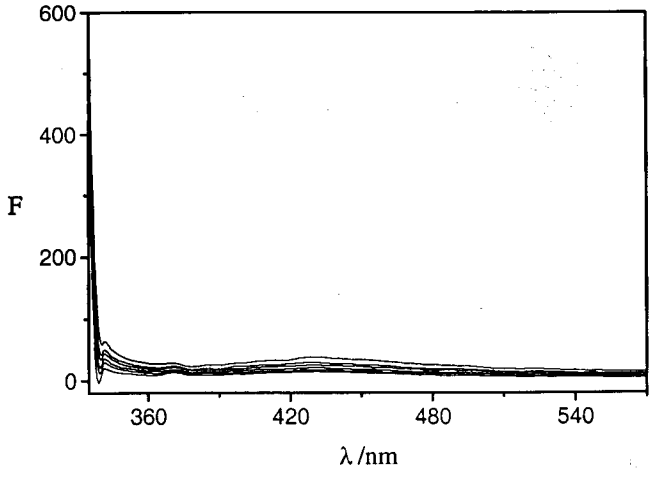


Figura 6.19 Espectros de emissão de suspensões em tampão Hepes contendo concentrações crescentes de vesículas unilamelares de DMPC em tampão Hepes (200 μM a 1000 μM), após excitação a 320 nm.

Na presença de concentrações crescentes de LUVs de DMPC e DMPG os espectros de emissão de fluorescência dos fármacos sofrem alterações, como se pode observar nas Figuras 6.20, 6.21 e 6.22. Nos três casos, essas alterações são mais pronunciadas em DMPG, como é de esperar atendendo aos coeficientes de partição já calculados e às características físico-químicas dos fármacos.

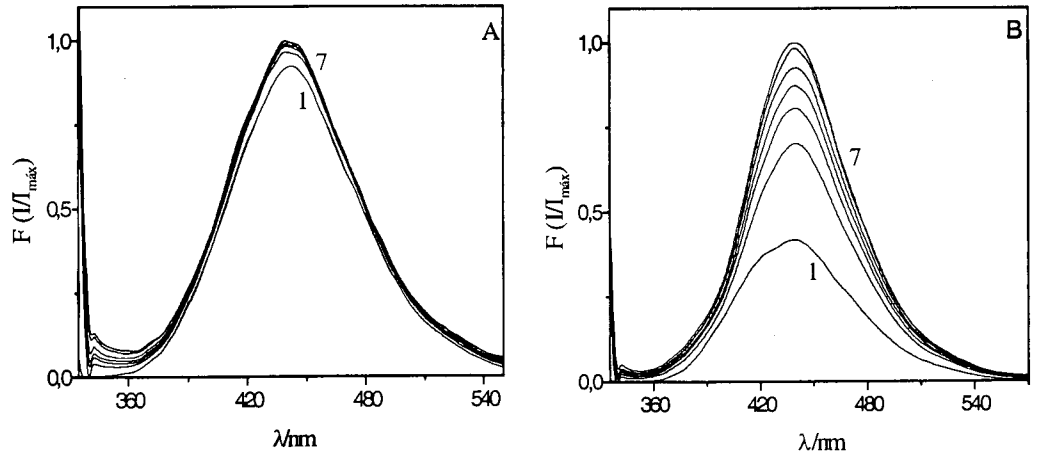


Figura 6.20 Espectros de emissão de fluorescência da grepafloxacina (10 μM) na ausência (1) e na presença (2-7) de concentrações crescentes de (A) DMPC e (B) DMPG. Concentrações de DMPC (μM): 185; 259; 461; 527; 645; 803. Concentrações de DMPG (μM): 193; 289; 401; 507; 613; 793. Comprimento de onda de excitação 330 nm.

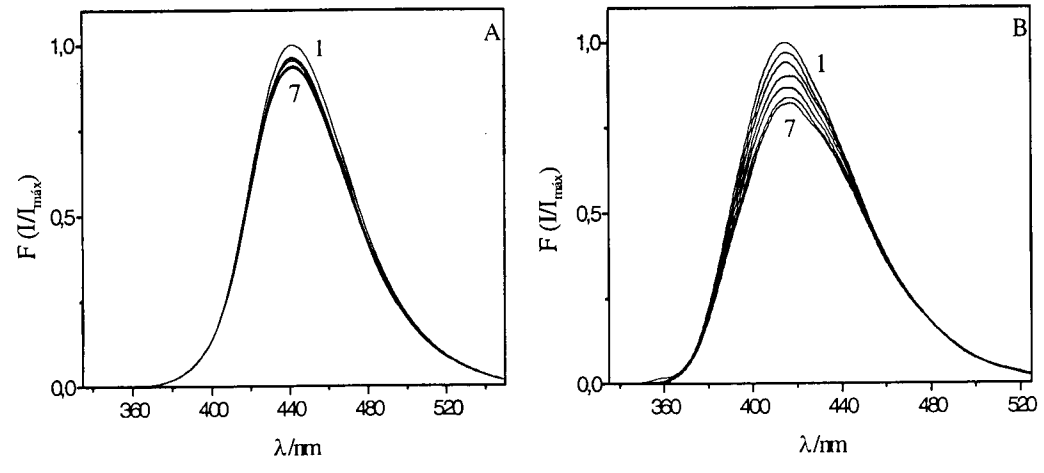


Figura 6.21 Espectros de emissão de fluorescência da norfloxacina (9,5 μM) na ausência (1) e na presença (2-7) de concentrações crescentes de (A) DMPC e (B) DMPG. Concentrações de DMPC (μM): 125; 239; 451; 523; 671; 743. Concentrações de DMPG (μM): 102; 213;325; 439; 547; 658. Comprimento de onda de excitação 320 nm.

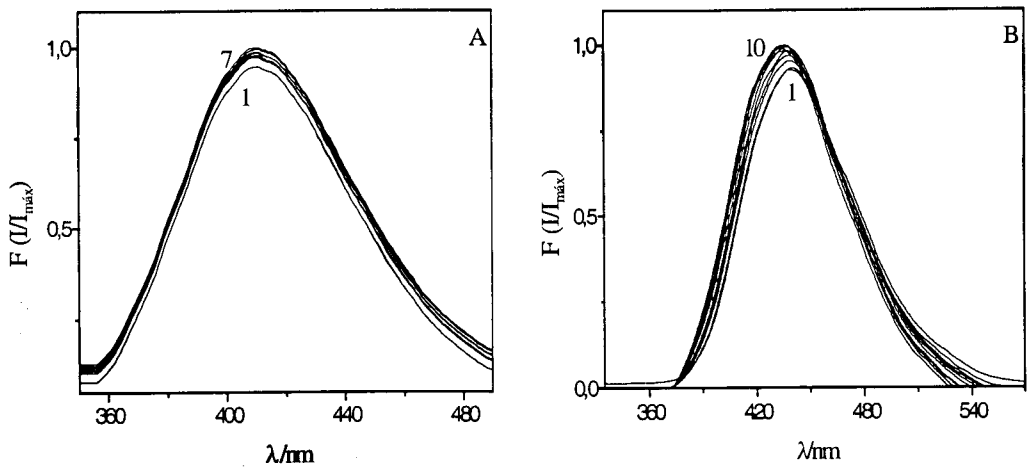


Figura 6.22 Espectros de emissão de fluorescência da griseofulvina (10 μM) na ausência (1) e na presença (2-7 e 2-10) de concentrações crescentes de (A) DMPC e (B) DMPG. Concentrações de DMPC (μM): 105; 221; 398; 537; 682; 769. Concentrações de DMPG (μM): 99; 199; 248; 312; 405; 499; 593; 686; 811. Comprimento de onda de excitação 295 nm.

Nos espectros da grepafloxacina e da griseofulvina observa-se um aumento da intensidade de emissão de fluorescência à medida que aumenta a concentração lipídica das suspensões e ocorre o deslocamento dos fármacos para o meio membranar. No caso da grepafloxacina, este aumento é muito superior em DMPG, indicando um domínio das forças electrostáticas relativamente às interacções hidrofóbicas no processo da partição (Pedrós, J. *et al.*, 1997). Nos espectros da griseofulvina em DMPG podem ainda observar-se dois pontos isosbésticos a 375 nm e a 454 nm, indicativos da presença em solução de duas formas do fármaco espectralmente distintas: forma livre e forma ligada (Connors K. A., 1987). O desvio dos valores de $\lambda_{máx}$ de emissão para a zona do azul e o aumento do rendimento quântico de fluorescência sugerem ainda penetração do fármaco no cerne hidrofóbico da membrana (Lakowics, J.R., 1999).

No que respeita à norfloxacina tal como nos espectros de absorção de UV-Vis, ocorre uma diminuição da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração lipídica. Também neste caso, a diminuição da intensidade de fluorescência é muito mais acentuada em DMPG, indicando uma maior interacção fármaco-lípido negativo.

Quer no caso da grepafloxacina, quer no da norfloxacina não de verificaram desvios dos $\lambda_{máx}$ de emissão na presença dos lipossomas o que indica uma interacção fármaco--lípido ao nível das regiões polares das vesículas fosfolipídicas (Lakowics, J.R., 1999) sem que ocorra penetração membranar.

Cálculo dos coeficientes de partição (K_p)

O cálculo dos coeficientes de partição efectuou-se pelo método de regressão não--linear, através do ajuste da equação (3.11) aos dados experimentais (ΔF versus [L]) e pelo método dos recíprocos duplos (equação 3.12). Os valores de ΔF resultam da diferença dos espectros de emissão dos fármacos, sós e com concentrações crescentes de lípido [L], aos $\lambda_{máx}$ de emissão. Ver Figura 6.23.

A curva ΔF versus [L] tem uma forma hiperbólica, tendendo para um máximo que corresponde à fluorescência das suspensões quando é atingido um estado de saturação membranar pelos fármacos se encontram ligados.

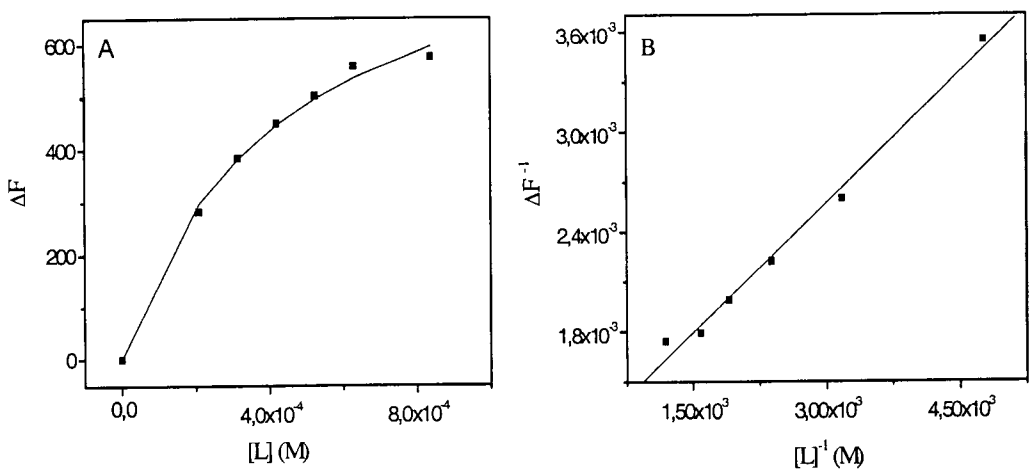


Figura 6.23 Ajuste das equações (3.11 e 3.12) aos dados experimentais obtidos. Método de regressão não linear (A) e método dos recíprocos duplos (B). Valores relativos aos espectros da grepafloxacina em DMPG a 440 nm.

Na Tabela 6.5 apresentam-se os coeficientes de partição dos fármacos em DMPC e DMPG, calculados pelo ajuste de regressão não linear (equação 3.11) aos dados experimentais obtidos.

Tabela 6.5 Coeficientes de partição da grepafloxacina, norfloxacina e griseofulvina em DMPC e DMPG.

	Coeficientes de partição (K_p / 10^4) [a]		
	Grepafloxacina	Norfloxacina	Griseofulvina
DMPC	1,43 ± 0,25	0,25 ± 0,05	1,68 ± 0,35
DMPG	14,69 ± 1,11	1,38 ± 0,04	6,45 ± 1,25

[a] Os resultados correspondem à média e respectivo desvio padrão de pelo menos três ensaios independentes.

Os coeficientes de partição calculados são idênticos, a menos do erro experimental, aos obtidos por espectrofotometria de UV-Vis. Assim, a espectrofluorimetria embora aplicável apenas a estudos com fármacos fluorescentes, mostrou-se expedita para a realização destes ensaios, tendo a vantagem de apresentar menos problemas relativos a fenómenos de dispersão de luz dispensando, consequentemente, a derivação dos espectros.

3 Determinação dos coeficientes de partição pelo método de separação de fases

O cálculo dos K_p efectuou-se por determinação da concentração dos fármacos nas fases lipídica e aquosa, obtidas após separação de fases, por espectrofotometria de UV-Vis. Para fazer o balanço material retiraram-se alíquotas das suspensões iniciais dos fármacos antes da centrifugação, das soluções aquosas contendo as moléculas de fármaco não encapsuladas, obtidas após filtração das suspensões através das membranas dos tubos Centricon® e das suspensões resultantes da ressuspensão dos sedimentos lipídicos, seguida da diluição com etanol de modo a provocar a lise das vesículas e libertação dos fármacos encapsulados. Estes

ensaios foram efectuados utilizando diferentes concentrações de DMPC: 500 μM, 1000 μM e 2000 μM e em todos os casos procedeu-se ao doseamento dos lípidos nos sedimentos e nos filtrados, de modo a verificar a ausência de DMPC na fase aquosa.

Os espectros obtidos para cada um dos fármacos encontram-se representados nas Figuras 6.24, 6.25 e 6.26.

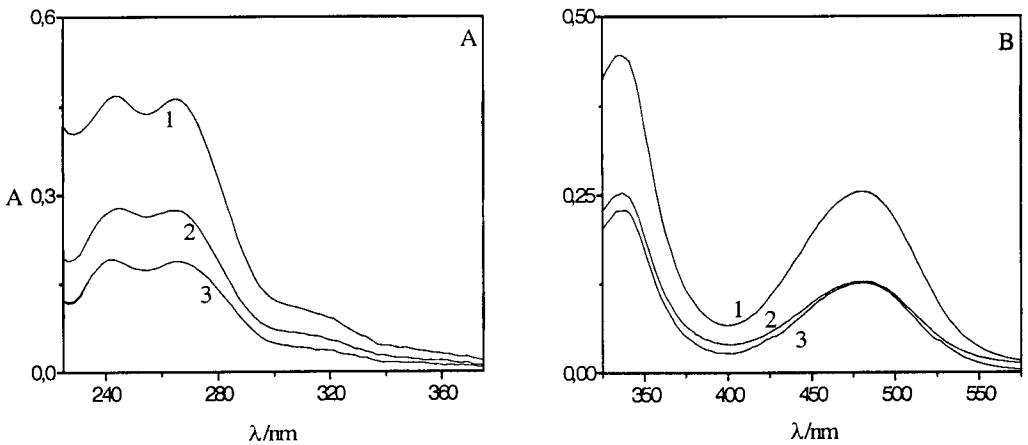


Figura 6.24 Espectros de absorção referentes às suspensões iniciais (1), aos filtrados (2) e às suspensões obtidas após ressuspensão dos sedimentos (3) resultantes da ultra-filtração de suspensões de LUVs de DMPC (1000 μM) contendo (A) clordiazepóxido (13,9 μM) e (B) rifampicina (22,3 μM), após diluição com etanol na proporção tampão Hepes:etanol de 1:10.

Os ensaios foram realizados apenas em DMPC visto não ter sido possível efectuar a separação das vesículas unilamelares de DMPG, quer porque precipitavam nos tubos Centricon® durante a fase de ultra-filtração, quer porque permaneciam em suspensão após ultracentrifugação a 100.000 g.

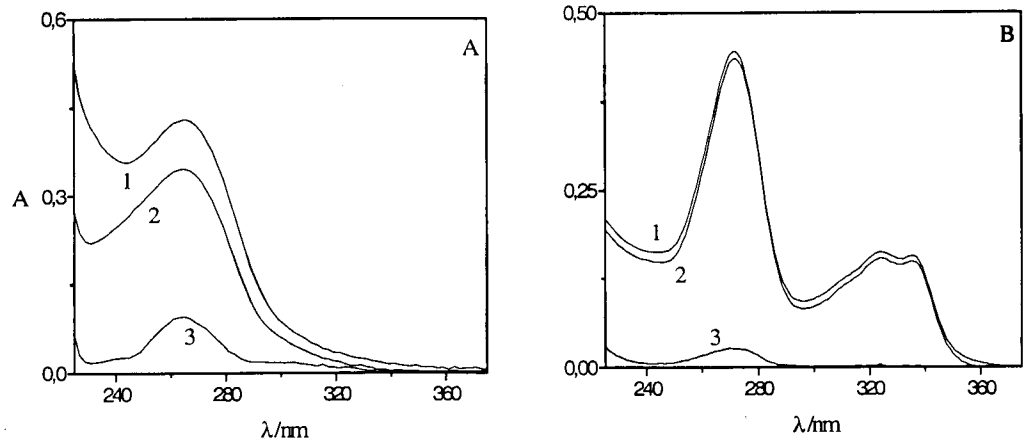


Figura 6.25 Espectros de absorção referentes às suspensões iniciais (1), aos filtrados (2) e às suspensões obtidas após ressuspensão dos sedimentos (3) resultantes da ultra-filtração de suspensões de LUVs de DMPC (1000 μM) contendo (A) isoniazida (97,2 μM), (B) norfloxacina (12,5 μM) e (C) dibucaína (170,0 μM), após diluição com etanol na proporção tampão Hepes:etanol de 1:10.

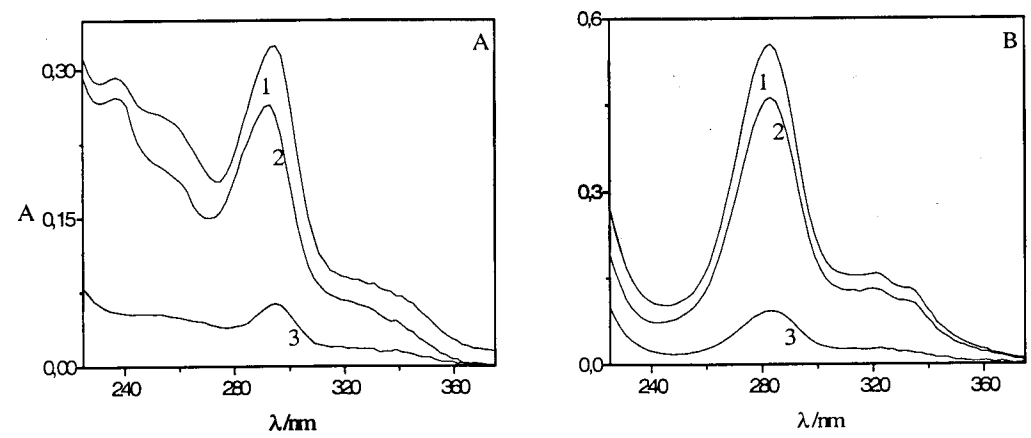


Figura 6.26 Espectros de absorção referentes às suspensões iniciais (1), aos filtrados (2) e às suspensões obtidas após ressuspensão dos sedimentos (3) resultantes da ultra-filtração de suspensões de LUVs de DMPC (1000 μM) contendo (A) griseofulvina (17,8 μM) e (B) grepafloxacina (12,5 μM), após diluição com etanol na proporção tampão Hepes:etanol de 1:10.

Os coeficientes de partição foram calculados a partir das concentrações de fármaco nos sedimentos e nos filtrados, determinadas espectrofotometricamente pela aplicação da equação de Lambert-Beer. Os valores apresentados na Tabela 6.6 resultam da média e respectivo desvio padrão de pelo menos três ensaios independentes, efectuados com lipossomas preparados quer na presença dos fármacos (processo vulgarmente designado por encapsulação), quer na sua ausência (processo de incubação), em que a solução de fármaco só é adicionada posteriormente. Em ambos os casos, e para as diferentes concentrações de lípido estudadas, foram obtidos resultados idênticos.

Tabela 6.6 Valores dos coeficientes de partição dos fármacos em lipossomas unilamelares de DMPC calculados após separação de fases por ultra-filtração.

Coeficientes de partição (K_p / 10^4)[a]						
Clordiazepóxido	Rifampicina	Isoniazida	Norfloxacina	Dibucaína	Griseofulvina	Grepafloxacina
2,11 ± 0,06	5,13 ± 0,53	0,86 ± 0,12	0,22 ± 0,03	1,54 ± 0,26	1,65 ± 0,05	1,40 ± 0,11

[a] Os resultados correspondem à média e respectivo desvio padrão de pelo menos três ensaios independentes.

Embora a determinação de K_p por processos que incluem separação das fases lipídica e aquosa promovam com frequência a alteração do estado de equilíbrio das amostras e tenham inerentes algumas dificuldades, tais como a manutenção da temperatura durante a fase de centrifugação, verificou-se que para os fármacos em questão esta técnica conduziu a resultados idênticos aos obtidos sem separação de fases, mostrando-se expedita para a realização deste tipo de estudos.

Paralelamente, procedeu-se também ao cálculo da eficácia de encapsulação (E.E.) dos fármacos nos lipossomas. A retenção de fármacos nos lipossomas é definida pela eficácia de encapsulação, que se exprime em percentagem, sendo as concentrações de fármaco expressas em g/l e as de lípido em mol/l (equação 3.13). Este parâmetro, sendo um quociente entre as razões fármaco/lípido iniciais e finais, representa uma medida da

eficiência do sistema inicial, constituído por uma mistura de lípido e fármaco, para encapsular, sob a forma de uma preparação lipossómica final, o fármaco inicialmente disponível. Os valores da E.E. dos fármacos em vesículas de DMPC (1000 μM) encontram-se representados na Tabela 6.7.

Tabela 6.7 Valores da E.E. dos fármacos em lipossomas unilamelares de DMPC.

Eficácia de Encapsulação (E.E.)[a]						
Clordiazepóxido	Rifampicina	Isoniazida	Norfloxacina	Dibucaína	Griseofulvina	Grepafloxacina
42,41 ± 3%	53,73 ± 5%	8,21 ± 2%	2,01 ± 0,3%	10,45 ± 2%	12,42 ± 3%	9,95 ± 4%

[a] Os resultados correspondem à média e respectivo desvio padrão de pelo menos três ensaios independentes.

As E.E. calculadas para cada fármaco estão de acordo com os respectivos coeficientes de partição, sendo elevadas para a rifampicina e clordiazepóxido e apresentando um valor muito reduzido no caso da norfloxacina.

4 Conclusões

Os resultados obtidos mostram ser possível a determinação dos coeficientes de partição de fármacos em sistemas água (tampão Hepes)/lipossomas de DMPC ou DMPG de forma precisa e exacta, utilizando dados de espectrofotometria derivativa, dados de espectroscopia de fluorescência e dados relativos à concentração dos fármacos na fase lipídica e aquosa, por espectrofotometria de UV-Vis, após separação de fases por ultra-filtração (no caso do DMPC).

Os coeficientes de partição calculados são independentes da concentração de fármaco utilizada e das concentrações de DMPC e DMPG, desde que estas não ultrapassem 2 mM. Além disso, também são independentes do método utilizado na preparação dos lipossomas (ressuspensão dos filmes com tampão Hepes contendo ou não os fármacos em estudo). Contudo, dada a natureza heterogénea dos sistemas em estudo para a obtenção de

valores de K_p fidedignos são necessários alguns cuidados experimentais. Relativamente à espectrofotometria derivativa, é indispensável:

a) a preparação de suspensões de referência contendo a mesma concentração lipídica das amostras de modo a permitir, após subtracção dos espectros, a eliminação total da dispersão de luz provocada pelas vesículas lipossómicas;

b) utilizar dados obtidos aos valores de λ_{min} ou $\lambda_{máx}$ dos espectros de segunda derivada.

Também é importante não esquecer o facto de que os fármacos com um pequeno coeficiente de extinção molar e K_p baixos são difíceis de estudar por este método. De facto, a razão sinal/ruído das funções de segunda derivada pode ser 10 vezes inferior à razão da função de ordem zero e os valores das derivadas tornam-se menos reprodutíveis. (Talsky, G. *et al.*, 1978), (Griffiths, T.R. *et al.*, 1982).

Nos estudos realizados com separação de fases, a utilização de tubos Centricon® permite a quantificação dos fármacos não encapsulados de forma rápida e eficiente, desde que:

a) a concentração de lípido seja mantida abaixo de 5 mM;

b) a temperatura de centrifugação se mantenha constante e acima da transição de fase;

c) se processe a determinação da concentração lipídica antes da centrifugação e na solução aquosa após separação de fases.

Os métodos utilizados permitem o cálculo de coeficientes de partição precisos e exactos dos vários fármacos em sistemas de água (Hepes)/ vesículas lipossómicas, como o comprovam os valores de K_p obtidos para a dibucaína, que é um fármaco amplamente estudado e cujos coeficientes de partição em vesículas lipossómicas estão descritos na literatura. Relativamente aos estudos em DMPC nenhum dos métodos apresenta vantagens efectivas sobre o outro, nomeadamente no que respeita ao tempo dispendido e dificuldade de execução, embora no caso dos fármacos que absorvem próximo ou abaixo dos 275 nm,

a necessidade de eliminar os fenómenos de dispersão de luz possa favorecer o método de separação de fases. Também no caso dos fármacos detentores de propriedades fluorescentes, a utilização da espectroscopia de fluorescência para a determinação dos K_p em DMPG, em detrimento da espectrofotometria de UV-Vis, revelou ser um método mais expedito pois, embora com resultados idênticos, as bandas de emissão são traçadas a comprimentos de onda maiores onde a dispersão de luz é nula. Na Tabela 6.8 encontram-se representados os valores dos K_p dos fármacos em DMPC e DMPG.

Tabela 6.8 Coeficientes de partição (K_p) dos fármacos em Hepes/DMPC, Hepes/DMPG e em sistemas água/*n*-octanol ($K_{a/o}$), bem como a solubilidade em água (S) a 25 °C[a].

	$K_p/10^4$ (DMPC)	$K_p/10^4$ (DMPG)	$K_{a/o}/10^{4b}$	S(mg/l)[c]
Clordiazepóxido	2,40 ± 0,05	2,56 ± 0,18	0,20	10,35
Rifampicina	5,11 ± 0,25	0,54 ± 0,25	1,74	$1,4x10^3$
Isoniazida	0,85 ± 0,12	0,59 ± 0,12	$0,2x10^{-4}$	$1,7x10^4$
Norfloxacina	0,22 ± 0,01	1,30 ± 0,06	$0,9x10^{-5}$	0,56
Dibucaína	1,51 ± 0,04	6,68 ± 0,62	0,033	28,44
Griseofulvina	1,69 ± 0,05	6,57 ± 1,20	0,015	8,64
Grepafloxacina	1,43 ± 0,03	14,79 ± 0,60	-	$3,6x10^4$

[a] O desvio padrão foi calculado assumindo que os métodos experimentais utilizados não diferem em precisão.[b] Valores obtidos a partir do programa KowWin e da referência (Meylan, W.M. e Howard, P.H., 1995). [c] Valores obtidos a partir do programa WsKow e da referência (Meylan, W.M. *et al.*, 1996)

Para o clordiazepóxido e isoniazida os valores de K_p são praticamente independentes do tipo de lípido utilizado. No entanto, em todos os outros casos, os valores de K_p em sistemas água/ DMPC são completamente diferentes dos obtidos em água/DMPG. Estas diferenças poderão estar relacionadas quer com as propriedades de ácido-base dos fármacos, como com as suas características hidrofóbicas.

No caso de fármacos neutros a pH 7,4, as interacções devem ser maioritariamente hidrofóbicas e, por outro lado, no caso de se encontrarem carregados positiva ou negativamente a este pH, as interacções deverão ser de carácter electrostático. Dado que o clordiazepóxido e a isoniazida são espécies neutras a pH fisiológico (pH 7,4), as interacções com as vesículas lipossómicas são fundamentalmente de carácter hidrofóbico, sendo a contribuição das interacções electrostáticas muito pequena ou nula. Pelo contrário, a rifampicina, a dibucaína, a norfloxacina e a grepafloxacina estão parcialmente ionizadas a pH 7,4 e, portanto, as interacções entre estes fármacos e as vesículas lipossómicas são não só de carácter hidrofóbico, mas estão sujeitas a uma significativa contribuição electrostática.

Analisando cada um dos fármacos podemos verificar que relativamente à rifampicina, cujo pK_a é 7,5, o coeficiente de partição é muito superior em DMPC, facto explicado pela existência a pH fisiológico de cerca de 50% das moléculas na forma aniónica, daí resultando fortes repulsões electrostáticas com as vesículas de DMPG carregadas negativamente. Por outro lado, a dibucaína (pK_a 8,85) (Coutinho, A. *et al.*, 1990) apresenta um K_p muito superior em DMPG, resultante de interacções electrostáticas verificadas entre as vesículas negativas e a forma catiónica do fármaco, que predomina (≈75%) a pH 7,4. O mesmo se verifica relativamente à partição em vesículas de fosfatidilserina, que é também um fosfolípido carregado negativamente (Papahadjopoulos, D. *et al.*, 1975), (Seelig, A. *et al.*, 1988).

As constantes de acidez da grepafloxacina (pK_{a1}= 6,78 pK_{a2}= 8,33) diferem das constantes da norfloxacina (pK_{a1}= 6,25 pK_{a2}= 8,44) e de outras fluoroquinolonas também estudadas, tais como a ofloxacina e cinoxacina, (Lee, D. *et al.*, 1994), (Drakopoulos, A.I. e Ioannou, P.C. 1997), principalmente no que respeita aos valores do pK_{a1}. Desta forma, e contrariamente às fluoroquinolonas de primeira geração que existem a pH fisiológico maioritariamente na forma de ião dipolar (90%), a grepafloxacina existe apenas 75% nesta forma e 20% na forma catiónica, sendo o seu coeficiente de partição em DMPG cerca de 10

vezes superior ao coeficiente determinado em DMPC. Estes resultados revelam uma maior afinidade do fármaco para com os lipossomas carregados negativamente, em consequência de interacções electrostáticas entre as formas catiónicas da grepafloxacina e os grupos fosfato carregados negativamente do DMPG. Também é importante realçar o facto do K_p da grepafloxacina em DMPC ser superior ao da norfloxacina, que pode explicar-se não só com base nas propriedades de ácido-base, como pela existência de dois grupos metilo nos aneis heterocíclico e piperazínico, que conduzem a um incremento das suas características hidrofóbicas e de empilhamento molecular (Vásquez, J.L. *et al.*, 1998). O mesmo acontece relativamente à ofloxacina e cinoxacina cujos K_p em DMPC, são da mesma ordem de grandeza dos da norfloxacina. Quanto à ciprofloxacina, que é uma das fluoroquinolonas de primeira geração mais estudadas e cuja estrutura química se assemelha à da grepafloxacina, apresenta um coeficiente de partição um pouco superior ao da norfloxacina mas ainda bastante reduzido (Gursoy, A. e Senyucel, B., 1997), (Vásquez, J.L. *et al.*, 1998).

Finalmente, os estudos com a griseofulvina revelam a existência de um K_p mais elevado em DMPG, podendo observar-se alterações nos espectros de emissão de fluorescência, com pontos isosbésticos e desvios do $\lambda_{máx}$, indicativos de que as propriedades de emissão da griseofulvina são sensíveis ao meio no qual está localizada. A griseofulvina é um fármaco com características hidrofóbicas muito acentuadas e baixa solubilidade em água. Encontra-se na forma neutra a pH fisiológico e, portanto, a sua partição nos sistemas água/DMPG não pode ser explicada com base em interacções electrostáticas. No entanto, os valores de potencial-zeta determinados mostram a sua localização preferencial à superfície membranar.

Os valores de K_p obtidos reforçam as lacunas da utilização de sistemas isotrópicos de dois solventes, tais como água/*n*-octanol, para prenunciar a partição de fármacos nas membranas celulares fosfolipídicas, especialmente no que se refere a espécies parcialmente ionizada.

A análise da Tabela 6.10 permite efectuar também uma comparação entre os valores dos K_p dos fármacos em DMPC e DMPG, obtidos por espectrofotometria derivativa, com os coeficientes de partição água/*n*-octanol. Estão também representadas as respectivas solubilidades em água.

Como podemos observar, se para os fármacos neutros existe uma certa relação entre os K_p e os $K_{a/o}$, para as espécies carregadas essa relação não pode ser estabelecida, como acontece para a rifampicina e dibucaína. Por outro lado, também a partição em lípidos electricamente neutros e carregados é diferente, permitindo uma maior aproximação dos estudos à realidade biológica e uma distinção entre as contribuições electrostáticas e hidrofóbicas nas interacções fármaco-lípido, importantes para o estudo da absorção, distribuição e efeitos terapêuticos dos fármacos.

Capítulo 7 | LOCALIZAÇÃO DOS FÁRMACOS NAS VESÍCULAS LIPOSSÓMICAS DE DMPC E DMPG: ESTUDOS DE ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA E DE RMN

O primeiro passo para o estudo das interacções físico-químicas dos fármacos com as vesículas lipossómicas consistiu na determinação dos seus coeficientes de partição água/ lípido. Os valores de K_p reflectem a distribuição dos fármacos entre as fases aquosa e lipídica e permitem avaliar, em certos casos, a penetração através das membranas ou interacções com as cabeças polares dos fosfolipidos. Para além disso, o conhecimento da posição dos fármacos na membrana e a sua orientação é de grande importância, especialmente quando estes actuam directamente nas membranas ou interactuam com moléculas aí localizadas, tais como enzimas ou receptores. O mesmo se passa quando os estudos visam a preparação de formulações lipossómicas utilizadas como veículos de fármacos (New, R.R.C., 1999), (Blatt, E. e Sawyer, W.H., 1985).

1 Estudos de localização efectuados por espectroscopia de fluorescência

Os ensaios de localização basearam-se em fenómenos de extinção e anisotropia de fluorescência, recorrendo à utilização de sondas espectroscópicas localizadas a diferentes profundidades nas membranas com características espectrais sensíveis ao meio envolvente. Estas sondas são particularmente úteis em estudos efectuados em membranas naturais, modelos membranares ou micelas e podem ser utilizadas para determinar a localização dos fármacos nas vesículas, bem como avaliar quantitativamente as suas interacções com os fosfolípidos (Grieser, F. e Drummond, C.J. 1988).

Nos estudos de extinção de fluorescência utilizaram-se sondas da série do ácido *n*-(9-antroiloxi)-esteárico, no caso dos fármacos não fluorescentes e o ião iodeto como agente de extinção, no caso dos fármacos fluorescentes.

Os estudos de anisotropia de fluorescência foram efectuados recorrendo às sondas DPH e TMA-DPH e realizados a várias temperaturas de modo a permitir avaliar não só a localização dos fármacos, como também as alterações de fluidez e da temperatura de transição de fase das membranas.

1.1 Estudos de localização efectuados por extinção de fluorescência dos fármacos pelo ião iodeto

As propriedades intrínsecas de fluorescência da griseofulvina e da grepafloxacina[¶] permitiram realizar estudos de localização através da utilização de um método baseado na extinção de fluorescência pelo ião iodeto.

Utilizou-se um intervalo de concentrações de KI de 0,001 M a 0,2 M, de modo a garantir a ausência de alterações da estrutura lipídica membranar induzidas quando na presença de concentrações mais elevadas (Chalpin, D.B. e Kleinfeld, A.M., 1983), (Montero, M. T. e Hernàndes-Borrell, J., 1994).

1.1.1 Estudos efectuados em LUVs de DMPC

Os resultados obtidos relativamente à extinção de fluorescência da griseofulvina e da grepafloxacina pelo iodeto em solução aquosa (tampão Hepes) e na presença de concentrações crescentes de vesículas unilamelares de DMPC encontram-se representados na Figura 7.1. Procedeu-se à excitação da griseofulvina e da grepafloxacina aos comprimentos de onda de 295 nm e 330 nm e à monitorização da fluorescência a 444 nm e a 441 nm, respectivamente.

A intensidade de fluorescência dos fármacos diminui à medida que aumenta a concentração de iodeto, sendo a referida diminuição mais acentuada quando estes se encontram em solução aquosa. Por outro lado, à medida que aumenta a concentração de

¶ O estudo de localização das fluoroquinolonas foi efectuado apenas para a grepafloxacina.

DMPC a variação da intensidade de fluorescência é menor, o que poderá dever-se quer a uma certa diluição do ião iodeto na fase lipídica das suspensões, com redução da concentração de iodeto em solução, quer à existência de uma fracção de fluoróforos incorporados nas membranas em zonas inacessíveis ao agente de extinção (Lacowicz, J.R., 1999).

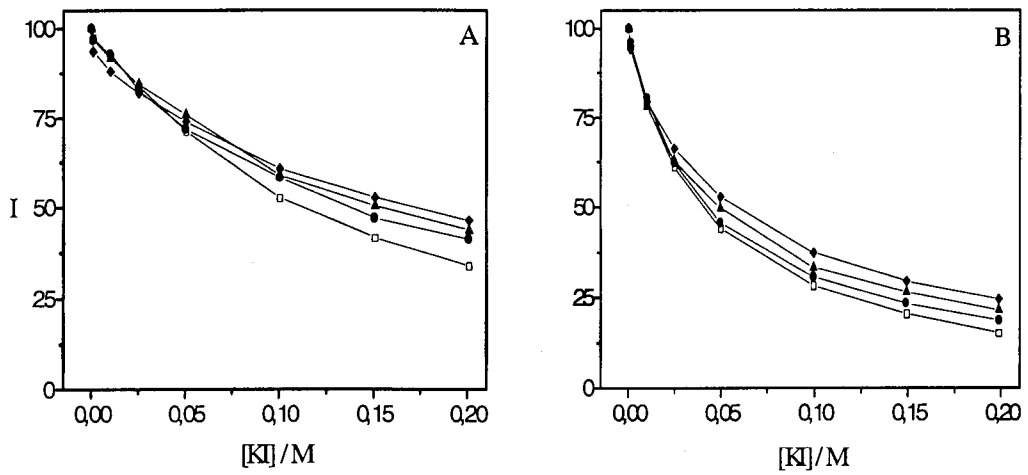


Figura 7.1 Variação da intensidade de fluorescência da (A) griseofulvina (10 mM) e da (B) grepafloxacina (10 mM) em função da concentração de KI, em tampão Hepes (*) e em suspensões de DMPC: 250 mM (●), 500 mM (▲) e 700 mM (◆)

Os fenómenos de extinção de fluorescência foram analisados segundo a equação de Stern-Volmer (3.27). A relação de Stern-Volmer para a variação da intensidade de fluorescência dos fármacos na presença do iodeto apresenta um comportamento linear, como se pode observar na Figura 7.2, sendo o declive das rectas tanto maior quanto menor a concentração em DMPC.

A linearidade da relação de Stern-Volmer observada em todos os casos aponta para um único processo de extinção de fluorescência. Atendendo a que tanto os processos estáticos como dinâmicos de extinção podem apresentar relações de Stern-Volmer lineares, tentou-se proceder à elucidação do fenómeno em causa traçando os espectros de absorção e de excitação de fluorescência dos fármacos na presença de iodeto.

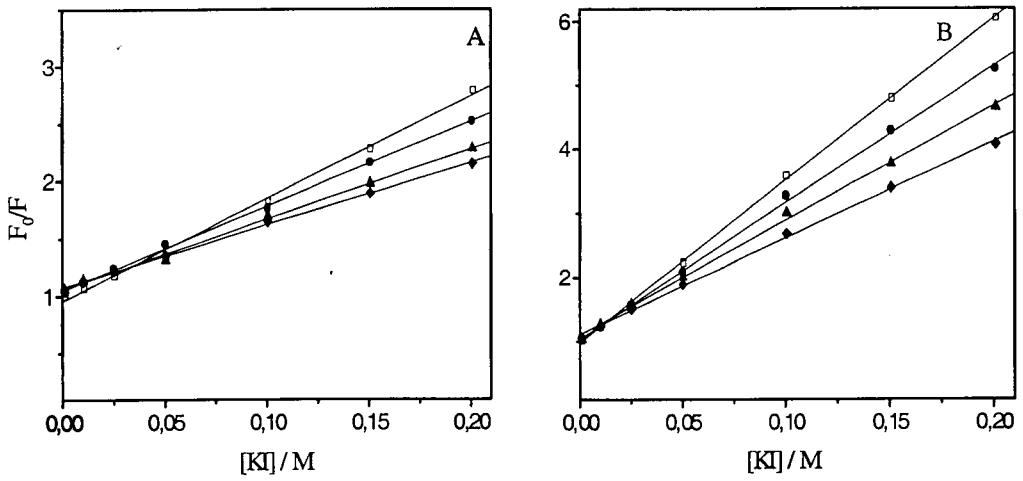


Figura 7.2 Representação gráfica da equação de Stern-Volmer para a desactivação de fluorescência da (A) griseofulvina e da (B) grepafloxacina pelo ião iodeto, em tampão Hepes (*) e em suspensões de DMPC: 250 mM (●), 500 mM (▲) e 700 mM (◆).

Na figura 7.3 podem observar-se os espectros referentes à griseofulvina, tendo-se obtido para a grepafloxacina resultados idênticos.

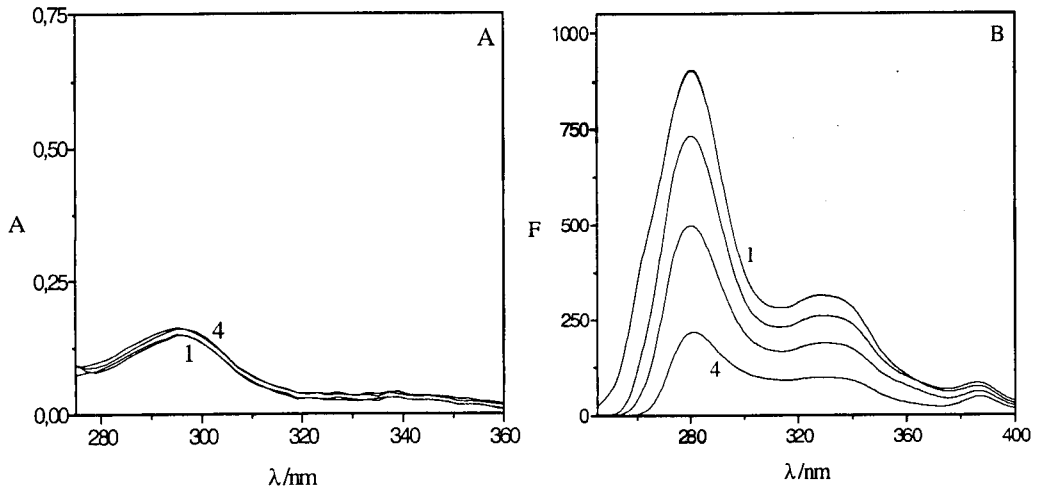


Figura 7.3 Espectros de absorção (A) e de excitação de fluorescência (B) da griseofulvina na presença de concentrações crescentes de ião iodeto (1-4): 0,0 M, 0,02 M, 0,1 M e 0,2 M.

Visto não existir qualquer alteração das bandas espectrais é possível concluir que se trata de um processo dinâmico de extinção de fluorescência (ver capítulo 3).

Os valores das constantes de Stern-Volmer (K_D) calculadas a partir dos declives das rectas F_0/F vs [KI], bem como os respectivos coeficientes de correlação linear (r), encontram-se representados na Tabela 7.1.

Tabela 7.1 Valores das constantes de Stern-Volmer (K_D) e respectivos coeficientes de correlação linear (r) para a griseofulvina e grepafloxacina.

DMPC (x 10^{-6} M)	Griseofulvina		Grepafloxacina	
	K_D[a]/M^{-1}	r	K_D[a]/M^{-1}	r
0	9,2 ± 0,4	0,9986	25,7 ± 0,2	0,9999
250	7,2 ± 0,2	0,9992	21,5 ± 0,3	0,9997
500	5,9 ± 0,1	0,9998	18,2 ± 0,6	0,9986
700	5,5 ± 0,1	0,9994	15,3 ± 0,3	0,9987

[a] Os resultados correspondem à média e respectivo desvio padrão de pelo menos dois conjuntos de ensaios independentes, cada um com um número de amostras igual ou superior a 7.

Analisando os valores de K_D é possivel verificar que a extinção de fluorescência por parte do iodeto é mais acentuada no caso da grepafloxacina. Sabe-se que a eficácia de extinção de fluorescência está relacionada não só com a especificidade do agente de extinção relativamente ao fluoróforo como também com a distância entre eles, que depende de factores estéricos e das cargas eléctricas das moléculas em questão (Slavik, J., 1994). Assim, agentes de extinção aniónicos tais como o iodeto, são repelidos por moléculas carregadas negativamente e atraídos por fluoróforos catiónicos. Tal como já foi anteriormente referido, a pH fisiológico cerca de 20 % da grepafloxacina existe na forma catiónica, ao contrário da griseofulvina que se encontra na sua totalidade na forma neutra. Deste modo, verifica-se uma certa atracção dos iões iodeto relativamente à grepafloxacina.

1.1.2 Estudos efectuados em LUVs de DMPG

Os resultados obtidos relativamente à extinção de fluorescência dos fármacos pelo iodeto em solução aquosa e na presença de lipossomas unilamelares de DMPG estão representados na Figura 7.4.

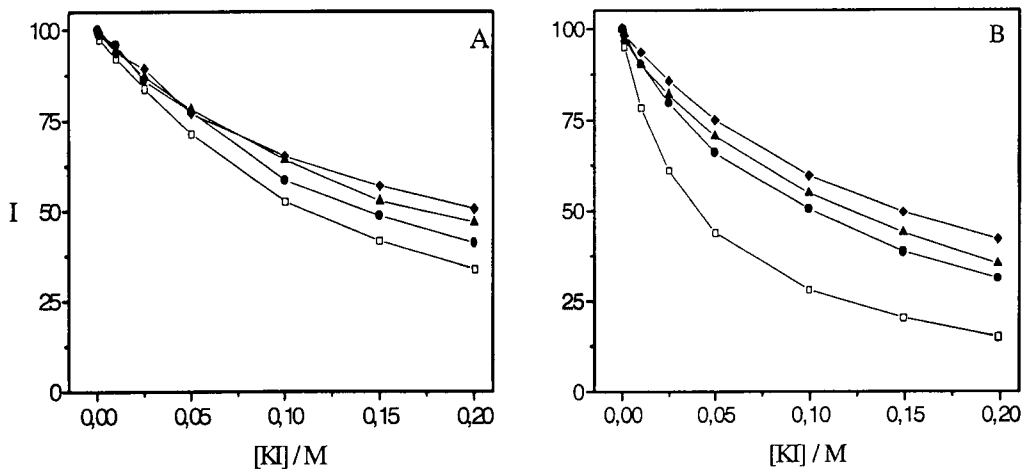


Figura 7.4 Variação da intensidade de fluorescência da (A) griseofulvina (10 mM) e da (B) grepafloxacina (10 mM) em função da concentração de KI, em tampão Hepes (*) e em suspensões de DMPG: 250 mM(●), 500 mM (▲) e 700 mM (♦).

A intensidade de fluorescência dos fármacos diminui na presença do ião iodeto, sendo a referida diminuição menos acentuada do que a verificada para iguais concentrações de DMPC, o que poderá traduzir-se numa maior incorporação dos fluoróforos nas membranas em locais inacessíveis ao agente de extinção (Lacowicz, J.R., 1999).

Os fenómenos de extinção de fluorescência foram também analizados de acordo com a equação de Stern-Volmer (3.14), estando a variação da intensidade de fluorescência dos fármacos na presença do iodeto representada na figura 7.5. As diferenças observadas relativamente às várias concentrações de DMPG podem explicar-se também devido à diluição dos iões de iodeto na fase lipídica. Embora ocorram repulsões electrostáticas entre os iões e as vesículas, estas podem ser superadas pelo facto das membranas constituidas por fosfolípidos aniónicos apresentarem um menor empacotamento na região das cabeças

polares fosfolipídicas comparativamente às membranas constituidas por moléculas neutras, devido às repulsões electrostáticas verificadas entre os grupos glicerol, o que facilita a penetração membranar de iões presentes em solução aquosa (New, R.R.C., 1990).

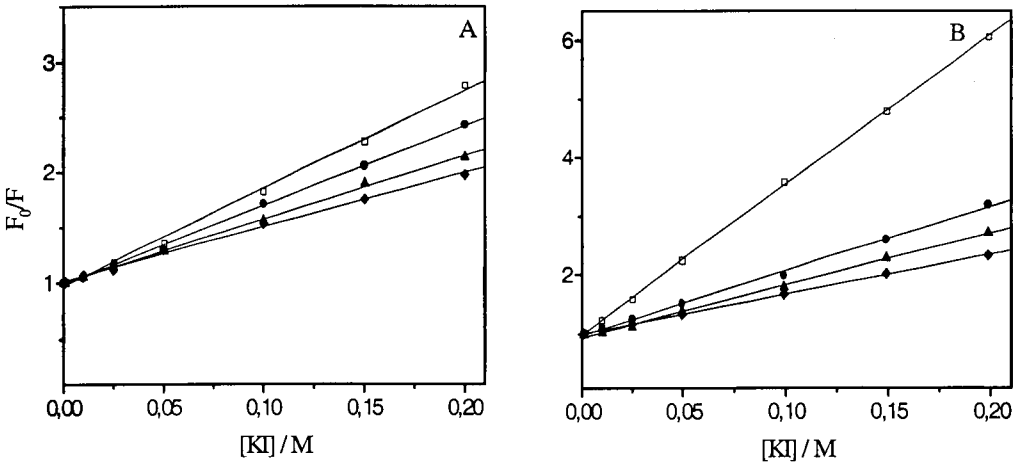


Figura 7.5 Representação gráfica da equação de Stern-Volmer para a extinção de fluorescência da (A) griseofulvina e da (B) grepafloxacina pelo ião iodeto, em tampão Hepes (*) e em suspensões de DMPG: 250 mM(●), 500 mM (▲) e 700 mM (◆).

Os valores das constantes de Stern-Volmer (K_D) e os respectivos coeficientes de correlação linear (r) encontram-se representados na Tabela 7.2.

Tabela 7.2 Valores das constantes de Stern-Volmer (K_D) e respectivos coeficientes de correlação linear (r) para a griseofulvina e grepafloxacina.

DMPG (x 10^{-6} M)	**Griseofulvina**		**Grepafloxacina**	
	K_D[a]/M^{-1}	r	K_D[a]/M^{-1}	r
0	9,2 ± 0,4	0,9986	25,7 ± 0,2	0,9999
250	7,2 ± 0,3	0,9991	10,9 ± 0,1	0,9987
500	5,8 ± 0,2	0,9994	8,8 ± 0,1	0,9990
700	4,9 ± 0,6	0,9984	6,7 ± 0,1	0,9998

[a] Os resultados correspondem à média e respectivo desvio padrão de pelo menos dois conjuntos de ensaios independentes, cada um com um número de amostras igual ou superior a 7.

Tal como nos ensaios em DMPC, também em DMPG é possível observar em todos os casos uma relação linear de F_0/F em função da concentração de KI, indicando a existência de um único processo de extinção nomeadamente, extinção colisional, visto não se observarem, como já foi referido, alterações dos espectros de absorção dos fármacos na presença de ião iodeto.

1.1.3 Conclusões

Para a grepafloxacina e para a griseofulvina as diferenças de intensidade de emissão de fluorescência em presença do ião iodeto, quando em solução aquosa ou quando incorporadas nos lipossomas, advém do seu posicionamento nas membranas ocorrer em locais menos acessíveis às pequenas moléculas do agente de extinção de fluorescência.

Analisando os resultados é possível concluir que a extinção de fluorescência dos fármacos em solução é superior à verificada na presença de vesículas lipossómicas e mais acentuada em DMPC do que em DMPG.

Assumindo que a extinção pelo iodeto se verifica maioritariamente em ambientes hidrofílicos, como a partição dos fármacos é superior em DMPG, vai existir um maior número de moléculas incorporadas nas vesículas negativas em locais inacessíveis ao iodeto, o que se traduz em valores das constantes de K_D menores, dado que apenas uma parte da fracção da fluorescência inicial, correspondente aos fármacos que permanecem em solução aquosa ou nas regiões mais hidrofílicas das estruturas membranares, pode ser extinta. Em termos de percentagens de variação das constantes de Stern-Volmer em solução aquosa e nas vesículas lipossómicas, ocorre uma diminuição de 41% para a griseofulvina e para a grepafloxacina em DMPC e de 47% para a griseofulvina e 74% para a grepafloxacina em DMPG.

Face a estes resultados pensa-se que o mecanismo através do qual a grepafloxacina permeia as membranas fosfolipídicas deve incluir num primeiro passo uma adsorção electrostática e/ou o estabelecimento de ligações de hidrogénio na região da interface

membranar (Vásquez, J.L. *et al.*, 1998). Atendendo à tendência das fluoroquinolonas para agregar em ambientes lipídicos, pode assumir-se um segundo passo relativamente à formação de microdomínios e acumulação na região de interface e ao aparecimento de um gradiente de concentrações do fármaco através das membranas por difusão passiva, encontrando-se as moléculas localizadas em zonas moderadamente hidrofóbicas das membranas (Vásquez, J.L. *et al.*, 2001), (Montero, M. T. e Hernàndes-Borrell, J., 1994a).

Relativamente à griseofulvina ocorre uma diminuição da extinção em DMPG superior à observada em DMPC o que está de acordo com os coeficientes de partição calculados e permite concluir que, principalmente na presença de lípidos negativos, uma maior percentagem de moléculas se encontra localizada em zonas hidrofóbicas da membrana, inacessíveis ao agente de extinção.

1.2 Estudos de localização efectuados por avaliação da interacção de fármacos com sondas membranares da série do ácido *n*-(9-antroiloxi)-esteárico

A utilização de sondas de fluorescência nos estudos de localização de fármacos, baseia-se na integração nas membranas de compostos constituidos por um grupo fluorescente covalentemente ligado a diferentes posições de um mesmo esqueleto hidrocarbonado, localizado paralelamente aos agentes anfifílicos das bicamadas ou micelas. Através da análise de fenómenos de extinção de fluorescência e de transferência de energia ocorridos na presença dos fármacos, é possível determinar com alguma exactidão a localização destes ao nível das membranas lipídicas (Cabrini, G. e Verkman, A.S., 1986).

As sondas da série do ácido *n*-(9-antroiloxi)-esteárico (*n*-AS) possuem um grupo antracénico ligado a diferentes posições de uma cadeia alquilo, assinaladas pela número *n* que corresponde ao átomo de carbono da cadeia referida, através de uma ligação éster (ver Figura 7.6). Após numerosos trabalhos já referenciados foi possível estabelecer a localização exacta dos grupos antracénicos nas membranas, situando-se na sonda 2-AS

próximo da região polar da bicamada fosfolipídica (a uma distância de 16,8 Å do centro da bicamada lipídica) e na sonda 12-AS mais profundamente, ao nível do interior das cadeias carbonadas (a uma distância de 7,5 Å do centro da bicamada lipídica) (Kaiser, D.R. e London, E., 1998), (Slavik, J., 1994).

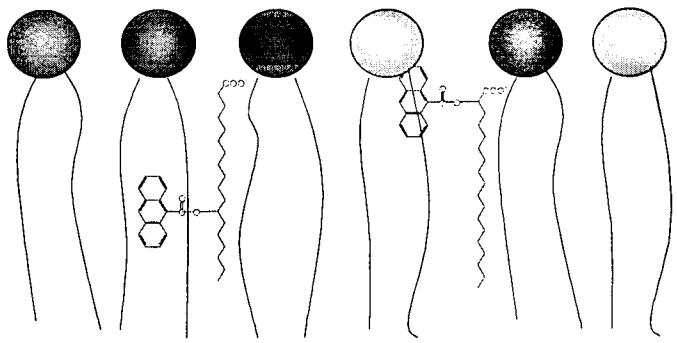


Figura 7.6 Representação esquemática da incorporação das sondas 2-AS e 12-AS em membranas fosfolipídicas.

Foram estudadas as interacções existentes entre fármacos não fluorescentes, nomeadamente o clordiazepóxido, a isoniazida e a rifampicina, com as sondas 2-AS e 12-AS, localizadas em vesículas unilamelares de DMPC e DMPG.

No caso da rifampicina, devido à sobreposição espectral entre o espectro de absorção do fármaco e de emissão das sondas *n*-AS, a extinção de fluorescência ocorre por transferência de energia (dador-aceitador).

1.2.1 Extinção de fluorescência das sondas *n*-AS pelo clordiazepóxido e isoniazida

O grau de inserção do clordiazepóxido e da isoniazida nas membranas fosfolipídicas foi determinado através de estudos de extinção de fluorescência das sondas 2-AS e 12-AS. Os ensaios foram conduzidos acima da temperatura de transição de fase dos lípidos, após excitação ao comprimento de onda máximo das sondas (390 nm), sendo a emissão monitorizada a 452 nm, no caso da sonda 2-AS, e a 446 nm no caso da 12-AS. Alguns

estudos efectuados (Blatt, E. e Ghiggino, K.P., 1981), (Garrison, M.D. *et al.*, 1994) demonstraram a ocorrência de desvios para menores comprimentos de onda dos espectros de emissão das sondas da série *n*-AS com o aumento do valor de *n*, sofrendo o $\lambda_{máx}$ de emissão um desvio para o azul à medida que o grupo fluoróforo se vai localizando mais interiormente na bicamada, num ambiente cada vez mais apolar (ver figura 7.6).

Foi utilizado um intervalo de concentrações de clordiazepóxido compreendida entre 5,0μM e 80,0 μM e de isoniazida entre 100,0 μM e 1200,0 μM, tendo os ensaios sido efectuados para várias concentrações de lípido, nomeadamente: 100, 250, 350, 500 e 700 μM.

Atendendo ao facto dos fármacos possuirem constantes de partição água/lípido tornou-se necessário proceder ao cálculo das suas concentrações efectivas na membrana. Estas foram determinadas a partir das concentrações totais recorrendo a um factor de correcção C_f (equação 3.29). Como volume molar das vesículas unilamelares de DMPC a 30 °C usou-se o valor de 0,659 l/mol (Marsh, D., 1990). Sendo a área/molécula do DMPG a pH>4 semelhante à área do DMPC e tendo ambos os lípidos propriedades termodinâmicas aproximadas, assumiu-se o mesmo valor de 0,659 l/mol para o volume molar do DMPG (Watts el al., 1981).

1.2.1.1 Estudos efectuados em LUVs de DMPC

A emissão de fluorescência das suspensões lipídicas de DMPC contendo as sondas foi monitorizada em função da concentração do agente de extinção e analisada de acordo com a equação de Stern-Volmer (equação 3.27). As relações de Stern-Volmer para a extinção de fluorescência das sondas 2-AS e 12-AS pelo clordiazepóxido e isoniazida encontram-se representadas na Figura 7.7.

Os resultados obtidos mostram que a fluorescência das sondas foi reduzida pelo clordiazepóxido mas não sofreu qualquer alteração na presença da isoniazida.

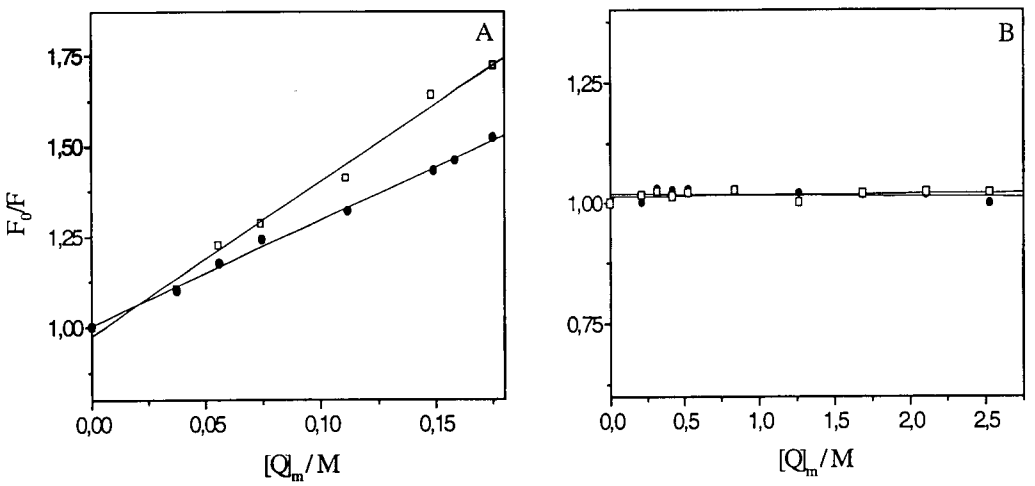


Figura 7.7 Representação gráfica da equação de Stern-Volmer para a extinção de fluorescência das sondas 2-AS (●) e 12-AS (□) em LUVs de DMPC (500 mM) pelo clordiazepóxido (A) e pela isoniazida (B).

Relativamente ao clordiazepóxido verifica-se a existência de uma relação de Stern-Volmer linear tanto nos ensaios com 2-AS, como com 12-AS no intervalo de concentrações de clordiazepóxido estudada, sendo a extinção da sonda 12-AS mais eficiente. Resultados idênticos foram observados para as restantes suspensões de DMPC.

Tal como nos ensaios com o ião iodeto, procedeu-se ao traçado dos espectros de absorção do fármaco na presença das sondas, de modo a verificar o tipo de extinção em causa. Os espectros obtidos com a sonda 12-AS revelaram a inexistência de qualquer alteração espectral, validando a hipótese do processo de extinção ser do tipo colisional. O mesmo se passou relativamente aos espectros traçados na presença da sonda 2-AS.

Os valores de K_D calculados reflectem a eficácia de extinção da fluorescência das sondas pelo clordiazepóxido e encontram-se representados na Tabela 7.3.Para qualquer concentração de DMPC os valores das constantes de Stern-Volmer são sempre superiores em 12-AS, o que parece indicar uma localização do clordiazepóxido numa região mais interna da membrana.

Tabela 7.3 Valores das constantes de Stern-Volmer (K_D) e respectivos coeficientes de correlação linear (r) para o clordiazepóxido em lipossomas de DMPC.

DMPC (x 10^{-6} M)	2-AS		12-AS	
	K_D[a]/M^{-1}	r	K_D[a]/M^{-1}	r
100	1,0 ± 0,1	0,983	1,4 ± 0,1	0,998
250	1,7 ± 0,1	0,986	2,5 ± 0,1	0,992
350	1,8 ± 0,1	0,991	2,8 ± 0,1	0,994
500	2,3 ± 0,1	0,997	3,2 ± 0,1	0,998
700	2,9 ± 0,1	0,998	4,1 ± 0,3	0,995

[a] Os resultados correspondem à média e respectivo desvio padrão de pelo menos dois conjuntos de ensaios independentes, cada um com um número de amostras igual ou superior a 8.

1.2.1.2 Estudos efectuados em LUVs de DMPG

Os ensaios efectuados em DMPG revelaram um comportamento dos fármacos relativamente às sondas idêntico ao observado em DMPC, verificando-se uma extinção de fluorescência apenas na presença de clordiazepóxido e uma ausência total de extinção no caso da isoniazida (ver figura 7.8).

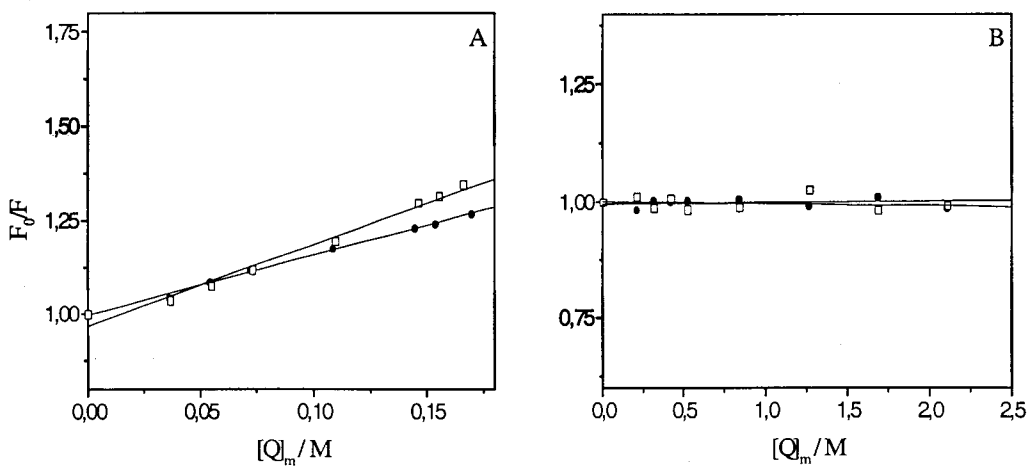


Figura 7.8 Representação gráfica da equação de Stern-Volmer para a extinção de fluorescência das sondas 2-AS (●) e 12-AS (□) em LUVs de DMPG (500 mM) pelo clordiazepóxido (A) e pela isoniazida (B).

Também neste caso foram obtidas relações de Stern-Volmer lineares indicando, de acordo com os estudos de espectroscopia de UV-Vis efectuados, um fenómeno de extinção de fluorescência do tipo colisional ou dinâmico.

Os valores das constantes de Stern-Volmer obtidos para a extinção de fluorescência das sondas 2-AS e 12-AS pelo clordiazepóxido, calculados a partir da equação (3.28) encontram-se representados na Tabela 7.4.

Tabela 7.4 Valores das constantes de Stern-Volmer (K_D) e respectivos coeficientes de correlação linear (r) para o clordiazepóxido em lipossomas de DMPG.

DMPG (x 10^{-6} M)	2-AS		12-AS	
	K_D[a]/M^{-1}	r	K_D[a]/M^{-1}	r
100	0,8 ± 0,1	0,993	0,7 ± 0,1	0,999
250	1,2 ± 0,1	0,990	1,3 ± 0,1	0,995
350	1,5 ± 0,1	0,985	1,6 ± 0,1	0,989
500	1,8 ± 0,1	0,998	1,8 ± 0,1	0,997
700	1,7 ± 0,1	0,996	2,2 ± 0,1	0,988

[a] Os resultados correspondem à média e respectivo desvio padrão de pelo menos dois conjuntos de ensaios independentes, cada um com um número de amostras igual ou superior a 8.

Os valores das constantes de Stern-Volmer relativos à extinção de fluorescência da sonda 12-AS pelo clordiazepóxido são praticamente iguais aos valores obtidos para a sonda 2-AS e, como é possível verificar, em qualquer um dos casos são inferiores aos valores calculados em DMPC.

1.2.1.3 Conclusões

A extinção de fluorescência requer uma situação de proximidade entre o fluoróforo e o agente de extinção, pelo que a eficácia de extinção de uma determinada série de sondas, tais como as *n*-AS, pode ser utilizada para inferir ácerca da localização de uma molécula em

membranas lipossómicas (Cabrini, G. e Verkman, A.S., 1986), (Garrison, M.D. *et al.*, 1994), (Sikaris, K.A. e Sawyer, W.H., 1982). Após determinação das constantes de Stern-Volmer relativas à extinção de fluorescência pelos fármacos das sondas 2-AS e 12-AS, foi possível concluir que tanto em DMPC como em DMPG a isoniazida deverá encontra-se à superficie membranar, suficientemente distante de qualquer das sondas para que não haja extinção de fluorescência. No que respeita ao clordiazepóxido verificou-se uma extinção mais eficiente da sonda 12-AS, principalmente em DMPC. A pH fisiológico o clordiazepóxido encontra-se numa forma neutra, estando possivelmente o grupo nitróxido, mais polar, próximo das cabeças polares fosfolipídicas e a zona mais apolar da molécula localizada entre as caudas hidrocarbonadas, alinhada de forma a diminuir o volume ocupado lateralmente (ver Figura 7.9).

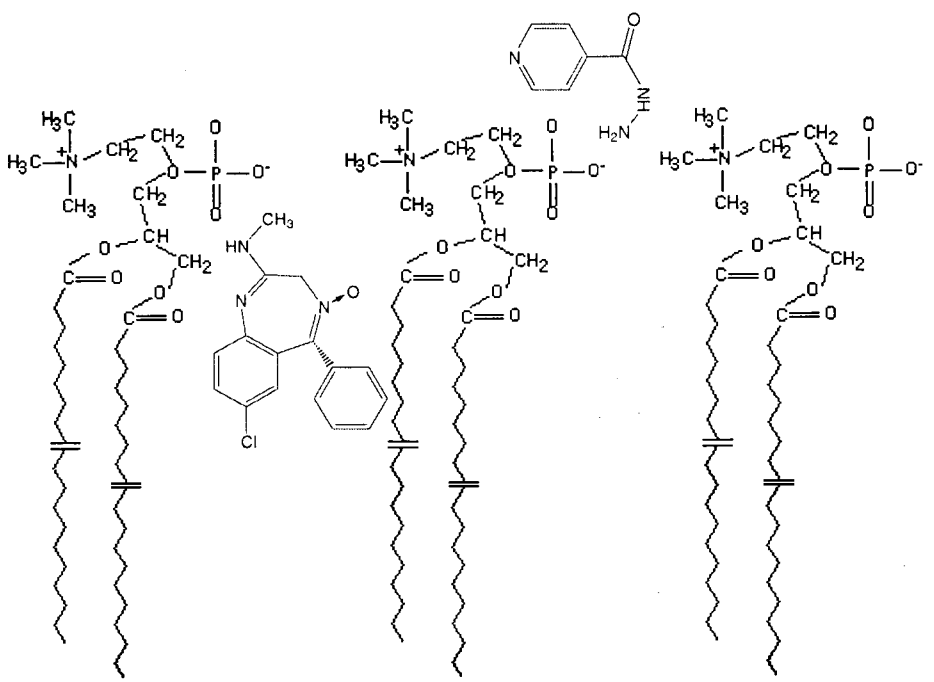


Figura 7.9 Representação esquemática da possível localização do clordiazepóxido e da isoniazida nas membranas fosfolipídicas de DMPC.

Atendendo ao facto da fluorescência emitida por ambas as sondas ser extinta pelo clordiazepóxido, deverão existir diferentes grupos funcionais na molécula responsáveis pela referida extinção, nomeadamente o grupo nitróxido (desactivador típico das sondas *n*-AS) e o cloro (Lacowicz, J.R., 1999). Sendo a sonda 12-AS a mais fortemente extinta, pensa-se que a região molecular do clordiazepóxido contendo o grupo Cl deverá estar localizada a cerca de 7-8 Å do interior da bicamada (Kaiser, R.D. e London, E., 1998).

A semelhança entre as constantes de Stern-Volmer obtidas sugere uma localização intermédia do clordiazepóxido entre as sondas 2-AS e 12-AS; tal pode ser explicado atendendo às repulsões electrostáticas verificadas ao nível das cabeças fosfolipídicas, que conduzem a um grau de curvatura das vesículas ligeiramente superior, estando as zonas polares das moléculas mais afastadas entre si e as caudas hidrocarbonadas mais compactadas em profundidade (Boggs, J.M., 1987). Esta disposição conduz à diminuição dos espaços existentes nas regiões mais hidrofóbicas das membranas, diminuindo a acessibilidade do fármaco à sonda 12-AS.

1.2.2 Extinção de fluorescência das sondas *n*-AS pela rifampicina

Os estudos de localização da rifampicina em vesículas unilamelares de DMPC e DMPG baseiam-se no fenómeno de transferência de energia de ressonância (RET), ocorrendo sobreposição espectral do espectro de emissão de fluorescência do dador com o espectro de absorção do aceitador. Neste caso, as sondas 2-AS e 12-AS actuam como dadores de energia (D) e a rifampicina como aceitador (A).

O cálculo teórico da eficiência da transferência de energia é dado pela equação (3.29) após determinação do valor de R_0, do número de moléculas de aceitador por área da membrana, *n*, e do valor do integral de sobreposição espectral, $J(\lambda)$, considerando que a transferência de energia se efectua num único plano.

A par do cálculo teórico da eficiência de transferência de energia efectuou-se a determinação experimental de acordo com a equação (3.35) isto é, utilizando os valores da intensidade de fluorescência do dador na ausência (F_D) e na presença (F_{DA}) do aceitador.

Estes cálculos implicam a determinação prévia das concentrações de fármaco ao nível da membrana, através do cálculo dos coeficientes C_f (ver equação 3.28) seguido do cálculo dos valores de n e das correcções relativas à intensidade de fluorescência das sondas na presença do fármaco no que respeita à excitação e emissão, visto a rifampicina absorver ao comprimento de onda de excitação das sondas (equações 3.25 e 3.26).

A comparação das eficiências de transferência de energia teóricas e experimentais permite inferir ácerca da localização membranar do fármaco, atendendo a que a localização das sondas é perfeitamente conhecida. Uma vez que o modelo teórico considera aceitadores e dadores no mesmo plano, os desvios experimentalmente verificados podem ser racionalizados admitindo que as moléculas se encontram em planos distintos, isto é, não tem a mesma localização transversal.

Os espectros de emissão das sondas 2-AS e 12-AS e o espectro de absorção da rifampicina em LUVs de DMPC e DMPG encontram-se na Figura 7.10.

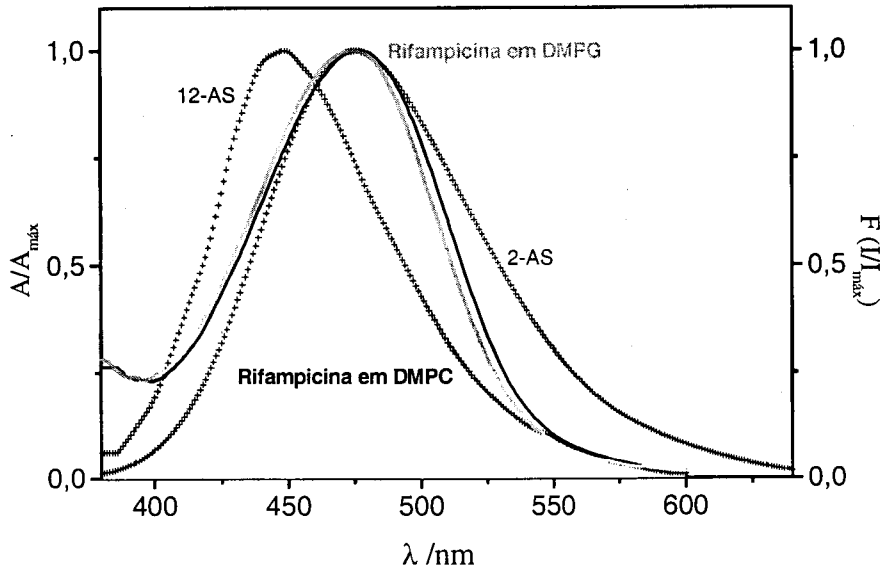


Figura 7.10 Espectros de emissão das sondas 2-AS e 12-AS (λ_{ex} 365 nm; escala da direita) e espectro de absorção (escala da esquerda) da rifampicina em LUVs de DMPC (zona sombreada) e DMPG.

A análise da Figura 7.10 revela a existência de uma elevada área de sobreposição espectral entre os espectros de emissão das sondas e o espectro de absorção da rifampicina quer em DMPC como em DMPG, existindo neste caso um ligeiro deslocamento do $\lambda_{máx}$ para menores comprimentos de onda.

1.2.2.1 Estudos efectuados em LUVs de DMPC

Os ensaios de transferência de energia foram efectuados utilizando um intervalo de concentrações totais de rifampicina (aceitador) entre 0 e 80 μM e cinco concentrações diferentes de DMPC (100, 250, 350, 500 e 700 μM), mantendo-se sempre uma relação sonda /lípido de 1:100. Foram realizados pelo menos dois ensaios independentes para cada concentração de DMPC.

Os valores experimentais das distâncias de Förster (R_0) e das eficiências de transferência de energia (E) foram independentes da concentração de DMPC e na Tabela 7.5 estão indicados os valores para uma concentração total de 15 μM de rifampicina em 500 μM de DMPC.

Tabela 7.5 Valores dos raios de Förster (R_0) e das eficiências de transferência de energia (E), para uma concentração total de 15 mM de rifampicina em 500 mM de DMPC.

	E	R_0(Å)
2-AS	0,65	31,2
12-AS	0,79	38,7

Os valores de R_0 obtidos sugerem uma maior sobreposição espectral relativamente à sonda 12-AS verificando-se, neste caso, uma maior eficiência de transferência de energia.

Na Figura 7.11 encontram-se representadas as variações das eficiências de transferência de energia teóricas e experimentais entre as sondas 2-AS e 12-AS e a rifampicina em LUVs de DMPC (500 μM).

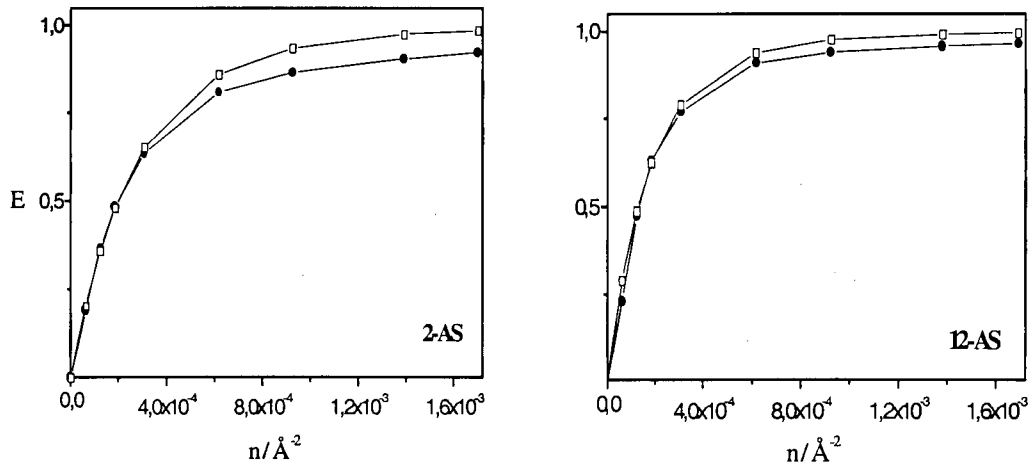


Figura 7.11 Eficiências teóricas (□) e experimentais (●) de transferência de energia entre as sondas 2-AS e 12-AS e a rifampicina em função de n /Å^2 (densidade superficial de aceitantes).

Verifica-se uma elevada concordância entre as eficiências teóricas e experimentais de transferência de energia, confirmando tratar-se de um fenómeno de transferência de energia entre a rifampicina e as sondas.

1.2.2.2 Estudos efectuados em LUVs de DMPG

Os ensaios de transferência de energia efectuados em DMPG foram também realizados utilizando um intervalo de concentrações totais de rifampicina entre 0 e 80 μM e cinco concentrações diferentes de DMPG (100, 250, 350, 500 e 700 μM), mantendo-se uma relação sonda /lípido de 1:100. Realizaram-se igualmente pelo menos dois ensaios independentes para cada concentração de DMPG e, tal como nos ensaios em DMPC, foram obtidos resultados idênticos para as diferentes concentrações de lípido.

Analisando os gráficos da variação das eficiências de transferência de energia teóricas e experimentais entre as sondas 2-AS e 12-AS e a rifampicina em LUVs de DMPG (Figura 7.12) verificou-se, no entanto, que principalmente no caso da sonda 2-AS as eficiências experimentais eram superiores às teóricas, indicando a existência de fenómenos suplementares de transferência de energia entre moléculas presentes na solução aquosa.

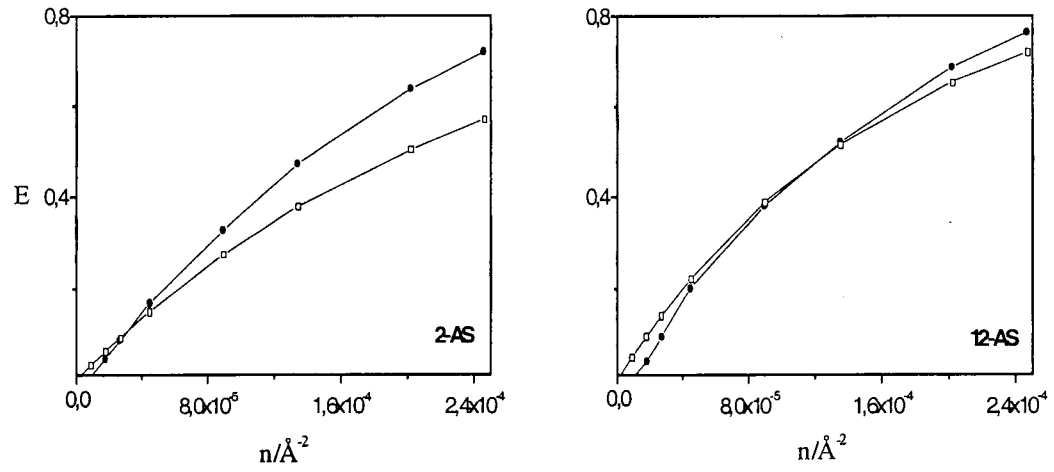


Figura 7.12 Eficiências teóricas (□) e experimentais (●) de transferência de energia entre as sondas 2-AS e 12-AS e a rifampicina em função de n /Å^2 (densidade superficial de aceitantes).

Recordando que as sondas da série do ácido *n*-(9-antroiloxi)esteárico se encontram ionizadas negativamente a pH fisiológico e atendendo a que a sua adição às suspensões lipossómicas ter sido efectuada pela técnica de injecção (ver capítulo 4), a ocorrência de repulsões electrostáticas entre sondas e vesículas terá conduzido, provavelmente, a uma diminuição da integração das sondas nas membranas e a um aumento da tendência para a formação de micelas ou outro tipo de agregados moleculares de sondas em solução, onde são igualmente operativos mecanismos de transferência de energia (Chalpin, D.B. e Kleinfeld, A.M., 1983).

De modo a proceder à determinação das concentrações micelares críticas das sondas, efectuaram-se ensaios baseados na dispersão de luz de suspensões das sondas em tampão Hepes, utilizando um intervalo de concentrações de 2 μM a 400 μM. As determinações foram realizadas a 37 °C num espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 50B, a 650 nm. Os resultados encontram-se representados na Figura 7.13.Analisando os resultados obtidos nos ensaios de dispersão de luz, verifica-se a ocorrência de formação de micelas no caso da sonda 2-AS, sendo o valor da CMC determinado pelo ponto de intersecção das rectas. Relativamente à sonda 12-AS não há formação de micelas mas podem observar-se

dois tipos diferentes de agregados em solução. Os resultados estão de acordo com a estrutura das sondas 2-AS e 12-AS, atendendo à posição do grupo antracénico, muito volumoso, na cadeia alquilo das moléculas que dificulta, no caso da sonda 12-AS a formação de estruturas micelares.

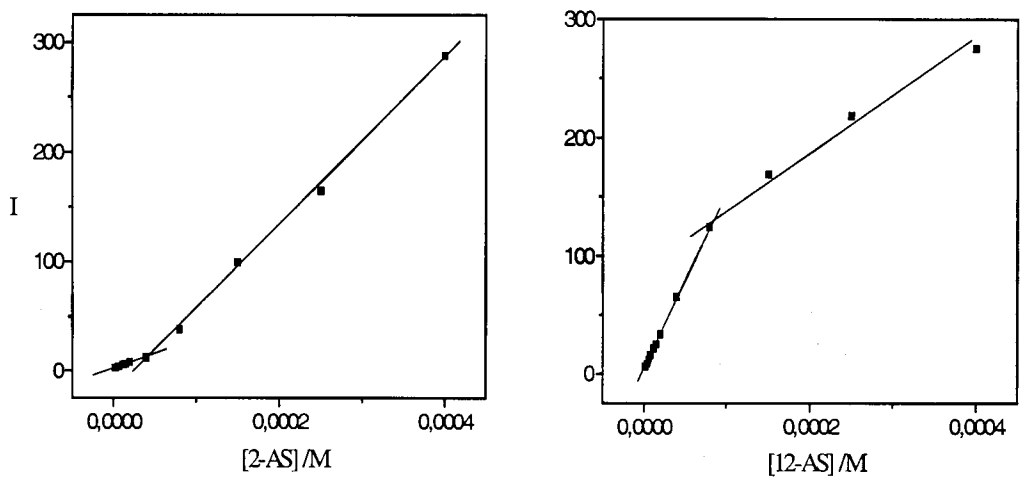


Figura 7.13 Representação da variação da intensidade de luz dispersa em função da concentração das sondas 2-AS e 12-AS em tampão Hepes.

Para tentar obviar o problema relativo à formação de agregados moleculares nas suspensões de DMPG procedeu-se então à incorporação das sondas fazendo um filme conjunto de cada uma delas com o lípido (500 μM DMPG). A execução de um filme conjunto permitiu a incorporação total das sondas nas vesículas lipossómicas, reduzindo a existência de sondas, sob outras formas, em solução (Figura 7.14).

Estes ensaios, baseados na formação de filmes conjuntos sonda-lípido, permitiram então a obtenção de eficiências teóricas superiores às experimentais, verificando-se uma maior concordância relativamente à sonda 2-AS.

Os valores dos raios de Förster (R_0) e das eficiências de transferência de energia (E) para uma concentração total de 15 μM de rifampicina em 500 μM de DMPG estão representados na Tabela 7.6.

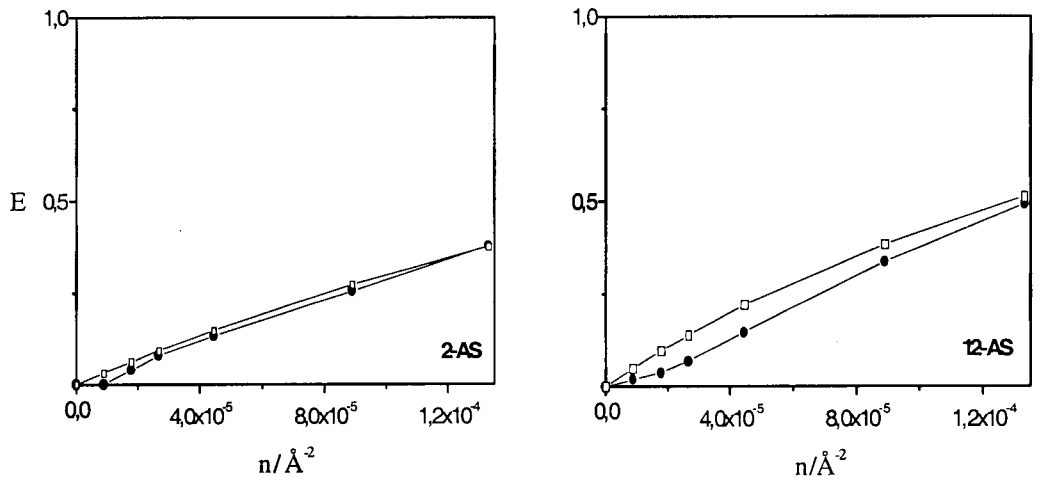


Figura 7.14 Eficiências teóricas (□) e experimentais (●) de transferência de energia entre as sondas 2-AS e 12-AS e a rifampicina em função de n /Å² (densidade superficial de aceitantes) obtidas pelo método do filme conjunto.

Tabela 7.6 Valores dos raios de Förster (R_0) e das eficiências de transferência de energia (E), para uma concentração total de 15 mM de rifampicina em 500 mM de DMPG.

	E	R_0(Å)
2-AS	0,13	31,0
12-AS	0,15	38,6

1.2.2.3 Conclusões

Nos estudos de transferência de energia efectuados foi observada, de uma forma geral, uma boa concordância entre os valores experimentais e as curvas teóricas, obtidas na base de uma distribuição aleatória das moléculas num sistema bidimensional. Deste modo, outros mecanismos de extinção de fluorescência, como contribuições estáticas ou dinâmicas, não serão certamente significativos.

Os desvios entre as curvas teóricas e experimentais permitiram ainda inferir sobre a localização transversal das sondas, uma vez que as curvas teóricas são obtidas considerando

dadores e aceitantes situados no mesmo plano. Deste modo, transferências experimentais inferiores ás teóricas poderão ser racionalizadas considerando que os dadores e aceitadores se situam em planos distintos, isto é, tem localizações diferenciadas na membrana.

Nos estudos realizados em DMPC (Figura 7.11) verifica-se uma excelente concordância na região inicial para ambas as sondas 2-As e 12-AS, sendo esta a mais crítica para a obtenção de informação topográfica. Deste modo poder-se-á concluir que a rifampicina ocupará uma localização sensivelmente equidistante entre as duas sondas. Embora se obtenha um maior desvio para o 2-AS no intervalo de maior concentração de aceitador, este não será eventualmente significativo uma vez que poderá resultar de heterogeneidades da sua distribuição.

Nos estudos efectuados com DMPG (Figura 7.14), a curva teórica é concordante com a experimental no caso do 2-AS e apresenta um desvio sistemático no caso do 12-AS para todo o intervalo de concentrações de aceitante, incluído o regime inicial. Este resultado evidencia que a rifampicina terá uma concentração essencialmente superficial cerca da interface da membrana neste sistema lipídico. Este facto será eventualmente devido à rifampicina se encontrar ionizada, existindo então uma certa repulsão electrostática com a superfície negativa da membrana, impedindo uma significativa internalização do fármaco.

1.3 Estudos de anisotropia de fluorescência

As membranas biológicas exibem uma estrutura global comum, altamente dinâmica e fluida, com as moléculas de fosfolípidos orientadas de modo a formar uma dupla camada na qual se inserem as proteinas membranares. A presença de fármacos pode levar à modificação das interacções verificadas entre os fosfolípidos e, consequentemente, conduzir a uma alteração da liberdade de movimentos e da fluidez. O DMPC e o DMPG são fosfolípidos saturados cuja temperatura de transição de fase é de aproximadamente 23 °C. Abaixo da T_m as membranas apresentam uma elevada viscosidade e uma ordem orientacional dos fosfolípidos muito elevada.

Um dos métodos mais utilizados no estudo da influência dos fármacos na estrutura membranar consiste na medição das alterações da anisotropia de fluorescência (*r*) de sondas específicas, cuja estrutura química lhes permite serem intercaladas na membrana. Através da sua utilização é possível avaliar o grau de fluidez das membranas, a temperatura de transição de fase e, dependendo da sua localização e orientação, obter informações acerca de alterações na estrutura membranar induzidas por fármacos, bem como da sua localização na bicamada lipídica.

O movimento destes fluoróforos, que se reflecte nos valores de anisotropia de fluorescência, depende da resistência à rotação exercida pelo meio que os rodeia. Assim, valores elevados de anisotropia reflectem uma elevada ordem estrutural e uma baixa fluidez de membrana, enquanto que baixos valores de anisotropia estão associados a elevada fluidez (Slavik, J., 1994).

As sondas de fluorescência utilizadas foram o DPH e o TMA-DPH (Figura 7.15), cujas caracteristicas e localização membranar já foram discutidas anteriormente (ver capítulo 3).

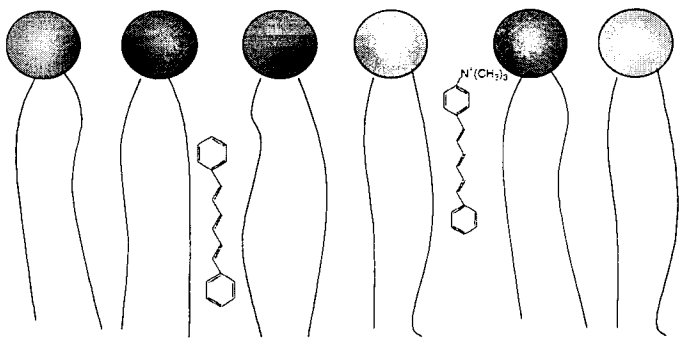


Figura 7.15 Representação esquemática da incorporação das sondas DPH e TMA-DPH em membranas fosfolipídicas.

Os ensaios de anisotropia foram efectuados em vesículas unilamelares de DMPC (1 mM) e DMPG (1 mM), num intervalo de temperaturas de 15 °C a 40 °C, para o clordiazepóxido, rifampicina, isoniazida, griseofulvina e grepafloxacina. Para o DPH o comprimento de onda de excitação foi fixado em 336nm e o de emissão em 450nm, enquanto que para o TMA-DPH, efectuou-se a excitação a 355nm e a emissão foi observada a 427nm.

1.3.1 Estudos efectuados em LUVs de DMPC

Os estudos efectuados na presença da isoniazida (264 μM), grepafloxacina (24 μM) e griseofulvina (17 μM) revelaram a inexistência de qualquer variação não só da anisotropia de fluorescência das sondas TMA-DPH e DPH, como também da temperatura de transição de fase do lípido, resultados que sugerem uma interacção mais ou menos superficial dos fármacos com as vesículas sem alteração da microviscosidade membranar ou do tempo de vida das sondas (Vásquez, J.L. *et al.*, 2001). Na Figura 7.16 está representada a variação da anisotropia da sonda TMA-DPH na presença da griseofulvina e a variação da anisotropia do DPH na presença da isoniazida.

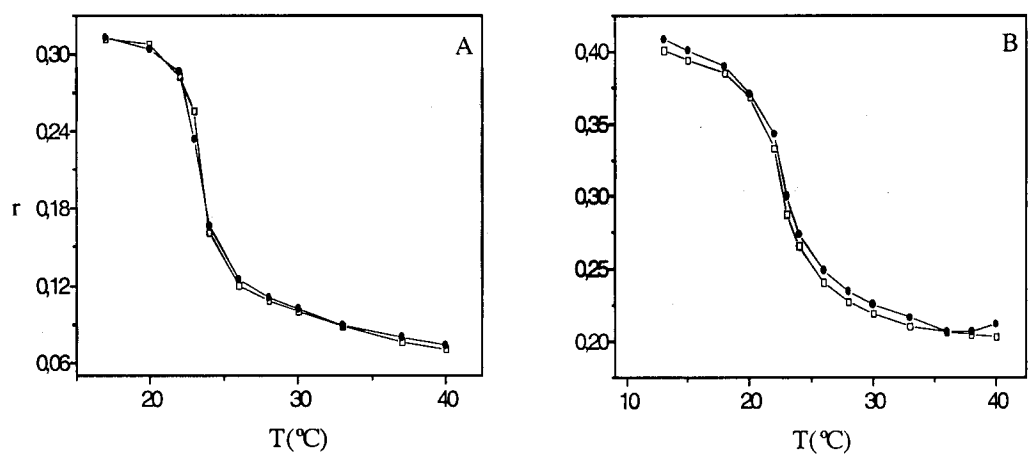


Figura 7.16 Variação, com a temperatura, da anisotropia de fluorescência (*r*) da sonda TMA-DPH (A) na ausência (□) e na presença (●) da isoniazida e (B) da sonda DPH na ausência (□) e na presença (●) da griseofulvina.

Relativamente aos estudos com clordiazepóxido (16 μM) não se observou alteração da temperatura de transição de fase do DMPC.Verificou-se, no entanto, um aumento da anisotropia de fluorescência das sondas, principalmente acima da temperatura de transição de fase, aumento esse superior no caso do TMA-DPH (Figura 7.17),

Finalmente, nos ensaios efectuados com a rifampicina (15 μM) verificou-se uma extinção total da fluorescência das sondas, que impediu o cálculo dos valores de anisotropia.

Provavelmente a referida extinção deverá estar relacionada com fenómenos de transferência de energia, visto ocorrer sobreposição espectral entre os espectros de emissão das sondas e o espectro de absorção do fármaco.

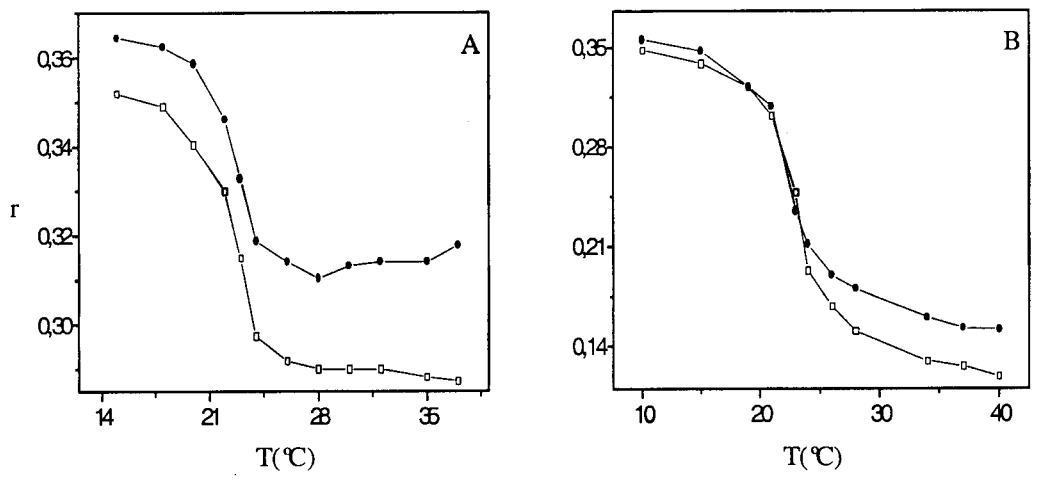


Figura 7.17 Variação, com a temperatura, da anisotropia de fluorescência (*r*) da sonda TMA-DPH (A) e da sonda DPH (B) na ausência (□) e na presença (●) do clordiazepóxido.

Traçaram-se igualmente espectros de absorção de soluções aquosas contendo rifampicina e as sondas, não se tendo observado quaisquer alterações espectrais, o que comprova o facto de não se tratar de um fenómeno de extinção estática.

Na Tabela 7.7 encontram-se os valores da temperatura de transição de fase do lípido na ausência e na presença dos fármacos, a partir dos ensaios efectuados com TMA-DPH e DPH. Os valores de T_m foram obtidos a partir do ponto de inflexão de um modelo sigmoidal[¶].

A análise da Tabela permite concluir que os fármacos estudados, nas concentrações dos ensaios, não alteram a temperatura de transição de fase do DMPC.

¶ O modelo sigmoidal não se encontra representado em nenhuma das figuras apresentadas.

Tabela 7.7 Temperatura de transição de fase (T_m) do DMPC na ausência e na presença dos fármacos.

T_m(°C)		DMPC	Isoniazida	Griseofulvina	Grepafloxacina
Clordiazepóxido					
TMA-DPH	22,7	22,3	**22,3**	22,7	22,7
DPH	**23,1**	23,3	**23,0**	23,3	23,9

1.3.2 Estudos efectuados em LUVs de DMPG

Em relação aos ensaios efectuados em DMPG na presença da isoniazida (260 μM), do clordiazepóxido (17 μM) e da rifampicina (9 μM) não se verificaram alterações da anisotropia de fluorescência das sondas, como se pode observar pela análise da Figura 7.18 onde estão representadas, a título exemplificativo, as anisotropias do TMA-DPH e DPH na presença do clordiazepóxido e da rifampicina, respectivamente.

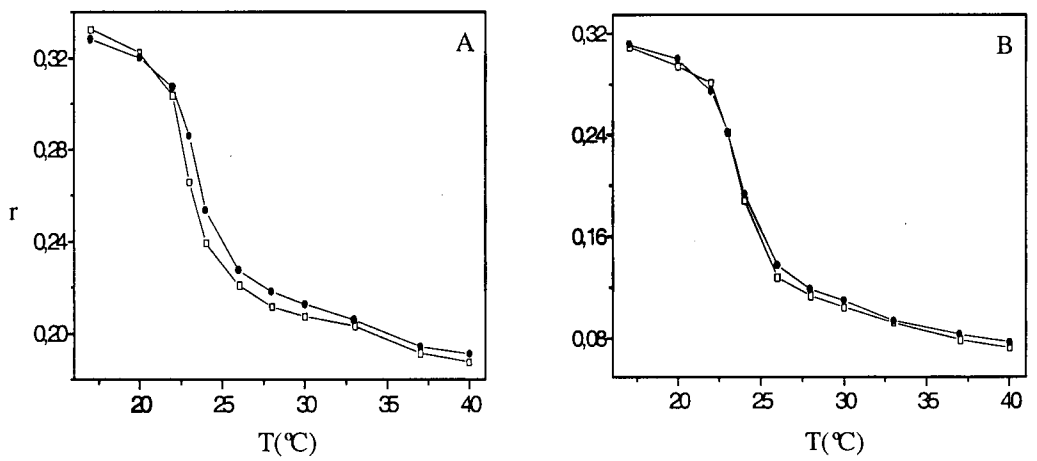


Figura 7.18 Variação, com a temperatura, da anisotropia de fluorescência (*r*) da sondaTMA-DPH (A) na ausência (□) e na presença (●) do clordiazepóxido e variação da anisotropia de fluorescência da sonda DPH (B) na ausência (□) e na presença (●) da rifampicina.

No caso da grepafloxacina (24 μM) verificou-se um aumento dos valores da anisotropia de fluorescência da sonda TMA-DPH, não se observando qualquer alteração relativamente ao DPH (Figura 7.19).

A griseofulvina (17 μM), ao contrário dos outros fármacos estudados, promoveu não só o aumento dos valores de anisotropia das sondas, como também da temperatura de transição de fase do DMPG (Figura 7.20).

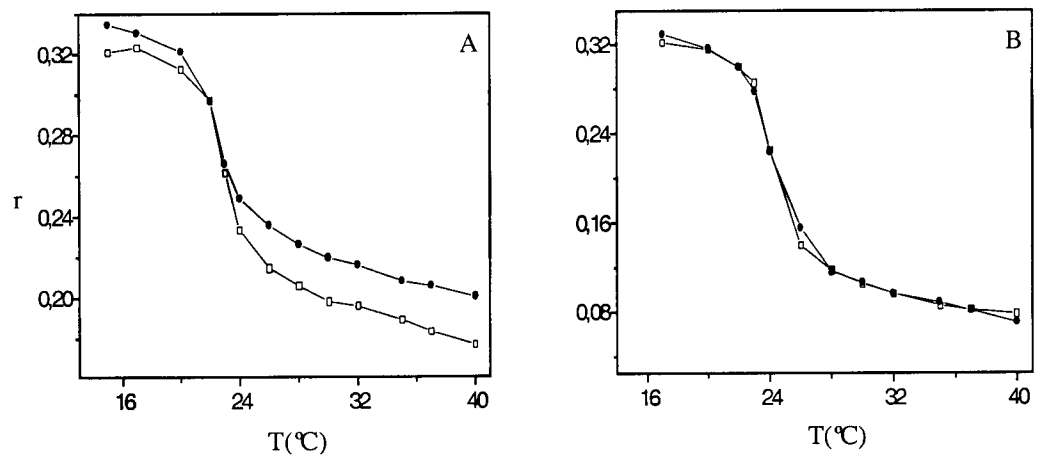


Figura 7.19 Variação, com a temperatura, da anisotropia de fluorescência (*r*) da sonda TMA-DPH (A) e da sonda DPH (B) na ausência (□) e na presença (●) da grepafloxacina.

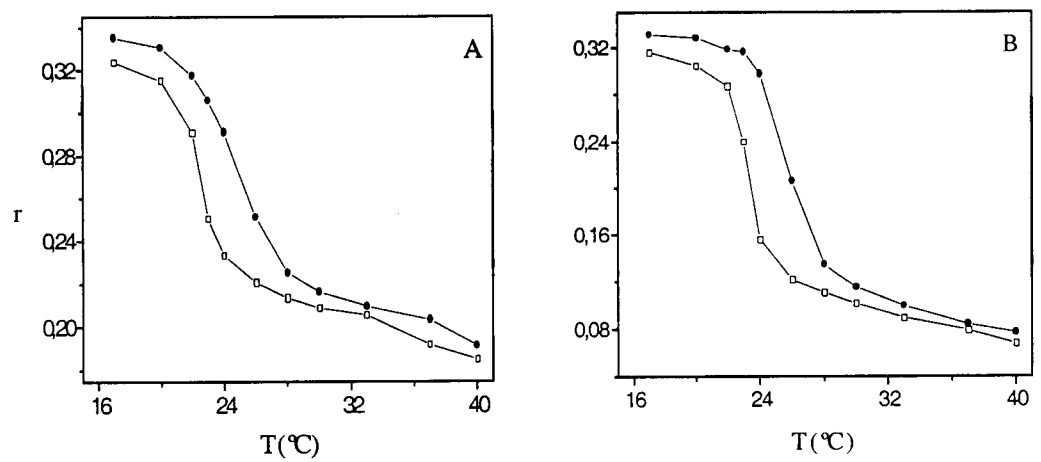


Figura 7.20 Variação, com a temperatura, da anisotropia de fluorescência (*r*) da sonda TMA-DPH (A) e da sonda DPH (B) na ausência (□) e na presença (●) da griseofulvina.

Na Tabela 7.8 encontram-se representados os valores da temperatura de transição de fase do DMPG na ausência e na presença dos fármacos, obtidos a partir dos ensaios efectuados com TMA-DPH e DPH a partir do ponto de inflexão de um modelo sigmoidal.

Tabela 7.8 Temperatura de transição de fase (T_m) do DMPG na ausência e na presença dos fármacos.

T_m(°C)	DMPC	Isoniazida	Griseofulvina	Grepafloxacina	Clordiazepóxido	Rifampicina
TMA-DPH	23,2	23,5	25,2	23,4	23,9	23,4
DPH	24,0	23,6	26,2	24,8	24,2	24,2

Verifica-se que só a griseofulvina altera a temperatura de transição de fase do DMPG, não ocorrendo variações de T_m na presença dos restantes fármacos.

1.3.3 Conclusões

Analisando os resultados obtidos para cada um dos fármacos é possível concluir que: relativamente à isoniazida não se observaram quaisquer alterações de T_m ou dos valores da anisotropia, quer em DMPC como em DMPG, o que vem comprovar a sua localização à superficie membranar. No que respeita à rifampicina não se observaram alterações da anisotropia em DMPG e em DMPC a desactivação total da fluorescência das sondas impediu o cálculo dos valores da anisotropia, embora tal facto demonstre uma acessibilidade do fármaco relativamente ao local de posicionamento das sondas. A grepafloxacina aumentou a anisotropia do TMA-DPH em DMPG acima da temperatura de transição de fase, indicando uma certa interacção do fármaco com a sonda, possivelmente ao nível das cabeças polares fosfolipídicas, visto não se observar qualquer alteração relativamente ao DPH.

Por outro lado, o clordiazepóxido alterou a anisotropia de ambas as sondas em DMPC verificando-se, no entanto, um efeito mais acentuado relativamente ao TMA-DPH. Em DMPG não ocorreu alteração da anisotropia das sondas, provavelmente devido à mesma razão apontada nos estudos de extinção de fluorescência das sondas 2-AS e 12-AS, relacionada com a menor acessibilidade do fármaco às regiões mais profundas das membranas de DMPG.

O aumento da anisotropia induzido pelos fármacos pode dever-se não ao facto de eles promoverem um aumento da rigidez da membrana, mas a uma diminuição dos tempos de

vida das sondas de fluorescência, visto as determinações serem efectuadas no estado estacionário, em que a anisotropia depende directamente do tempo de vida dos fluoróforos (Lacowicz, J.R., 1999).

Finalmente, a griseofulvina alterou a anisotropia das sondas em DMPG e aumentou a temperatura de transição de fase do lípido aproximadamente 3 ° C. Este aumento revela uma maior microviscosidade da membrana fosfolipídica e a consequente diminuição do tempo de correlação rotacional das sondas de acordo com a equação de Perrin (equação 3.38) (Ikeda, T. *et al.*, 1983).

2 Estudos de localização efectuados por ^{1}H-RMN na presença do catião praseodímio (Pr^{3+})

As vesículas lipossómicas, devido à sua natureza coloidal, proporcionam a obtenção de espectros de ressonância magnética nuclear protónica (^{1}H-RMN) de elevada resolução e constituem modelos excelentes para a interpretação das interacções de fármacos com as membranas celulares (Betageri, G.V. *et al.*, 1989). A adição de iões lantanídeo permite observar o desdobramento do pico referente ao grupo polar fosfolípidico, em consequência da existência de ambientes diferentes dos protões localizados no interior e no exterior da dupla membrana. Assim sendo, o grau de interacção de diferentes fármacos com vesículas lipossómicas pode ser avaliado pela capacidade relativa de cada fármaco em deslocar os iões lantanídeo da superfície membranar.

Neste capítulo descreve-se o estudo das interacções dos fármacos com lipossomas unilamelares de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), de 100 nm de diâmetro, na presença do catião praseodímio (Pr^{3+}), a 37 °C. Relativamente ao DMPG não foi possível a execução deste tipo de ensaios visto ocorrer precipitação das vesículas após junção do catião praseodímio. Tentou-se igualmente a utilização de europio tris(6,6,7,7,8,8,8-heptafluoro-2,2-dimetil-3,5-octanedionato) $Eu(fod)_3$ da Aldrich verificando-se a mesma instabilidade.

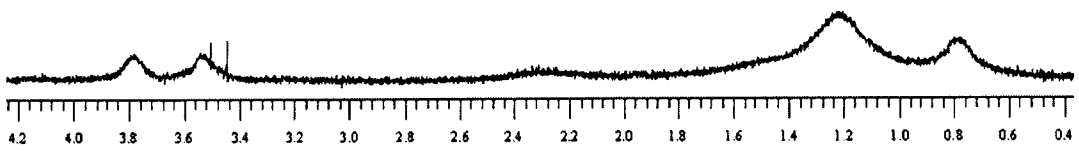


Figura 7.21 Espectro de ^{1}H-RMN de uma suspensão lipossómica de DMPG

Como a análise do espectro de ^{1}H-RMN do DMPG (Figura 7.23) permite observar o desdobramento do pico referente ao grupo polar fosfolipídico, mesmo na ausência de iões lantanídeos, fez-se o estudo das interacções dos fármacos na ausência destes iões. Contudo, os ensaios efectuados com diferentes concentrações de fármacos não revelaram qualquer alteração espectral.

O espectro de ^{1}H-RMN das vesículas de DMPC apresenta um singuleto a 3,21 ppm, correspondente aos protões do grupo colina do DMPC e dois sinais a 1,23 ppm e 0,84 ppm, relativos, respectivamente, aos protões dos grupos metil e metileno das caudas apolares fosfolipídicas (Levine,Y.K. *et al.* 1973).

A adição de praseodímio promoveu o desdobramento do sinal correspondente aos protões dos grupos trimetilamónio das moléculas localizadas na superficie externa (E) e interna (I) da bicamada membranar, ocorrendo um deslocamento do pico externo para campos mais baixos e um deslocamento ligeiro do pico interno para campos mais altos (Bystrov, V.F. *et al.*, 1972) como se pode observar pela análise das Figuras 7.22 e 7.23.

Os valores referentes aos desvios químicos, obtidos para diferentes concentrações de catião praseodímio (Pr^{3+}), encontram-se representados na Tabela 7.9 e resultam da média de pelo menos dois ensaios independentes.

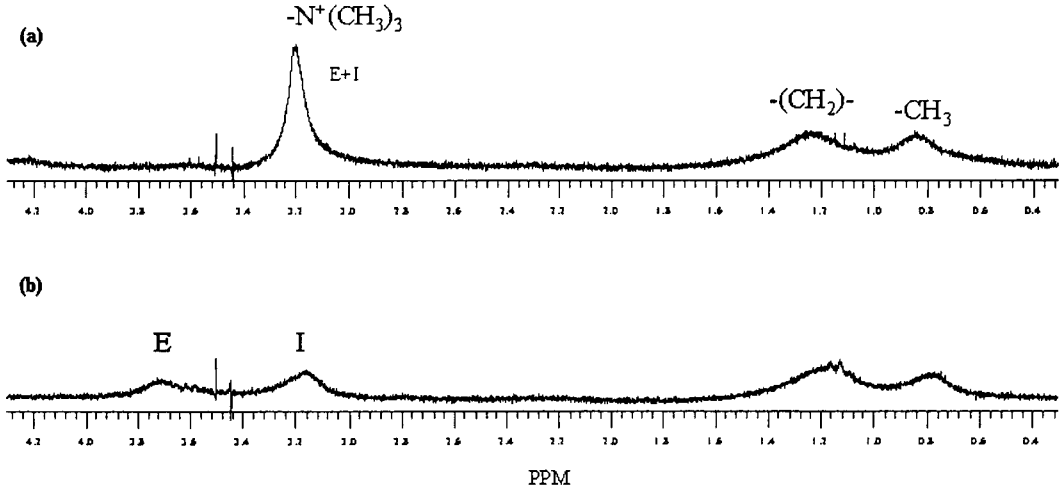


Figura 7.22 Espectros de ^{1}H-RMN de (a) suspensão lipossómica de DMPC (14 mM) e (b) suspensão lipossómica de DMPC e Pr^{3+} (10 mM), onde é possível observar o desdobramento do sinal correspondente aos protões dos grupos trimetilamónio das moléculas localizadas na superficie externa (E) e interna (I) da bicamada membranar.

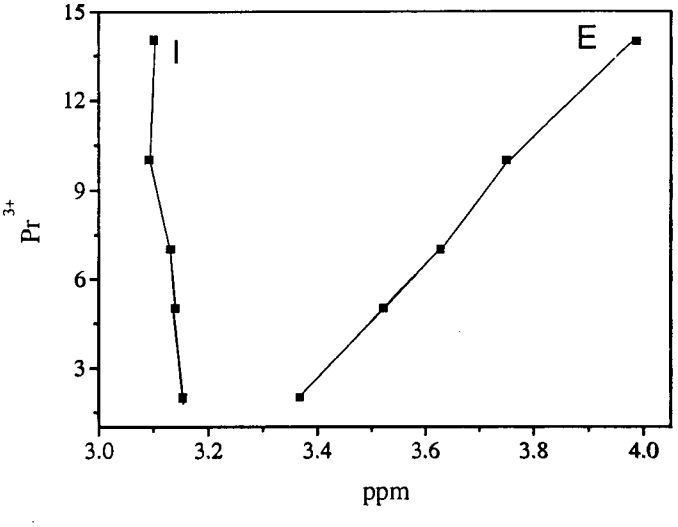


Figura 7.23 Valores dos desvios químicos dos sinais externo (E) e interno (I) dos grupos N-metil colina das moléculas fosfolipídicas de DMPC em função da concentração de praseodímio.

Tabela 7.9 Desvios químicos dos sinais referentes às vesículas de DMPC em função da concentração de Pr^{3+}.

Pr^{3+} (mM)	Sinal externo	Sinal interno	$-(CH_2)-$	$-CH_3$
0	3,21		1,23	0,84
2	3,37	3,15	1,23	0,84
5	3,52	3,14	1,19	0,80
7	3,63	3,13	1,20	0,83
10	3,75	3,09	1,15	0,76
14	3,99	3,10	1,09	0,78

A diferença referente aos deslocamentos químicos dos picos interno e externo (Δppm) do grupo colina aumenta linearmente em função da concentração de Pr^{3+} adicionado, como era esprado (Figura 7.24).

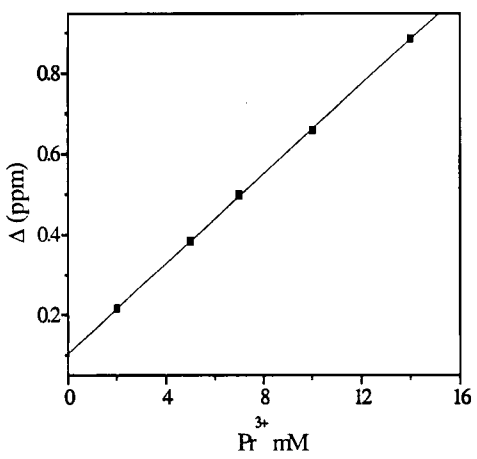


Figura 7.24 Diferenças referentes aos deslocamentos químicos dos picos interno e externo (Dppm) do grupo colina em função da concentração de Pr^{3+}.

A adição de concentrações crescentes dos vários fármacos em estudo inverte o efeito do Pr^{3+}, observando-se uma diminuição de Δppm e a união dos picos, como se pode observar pela análise da Figura 7.25.

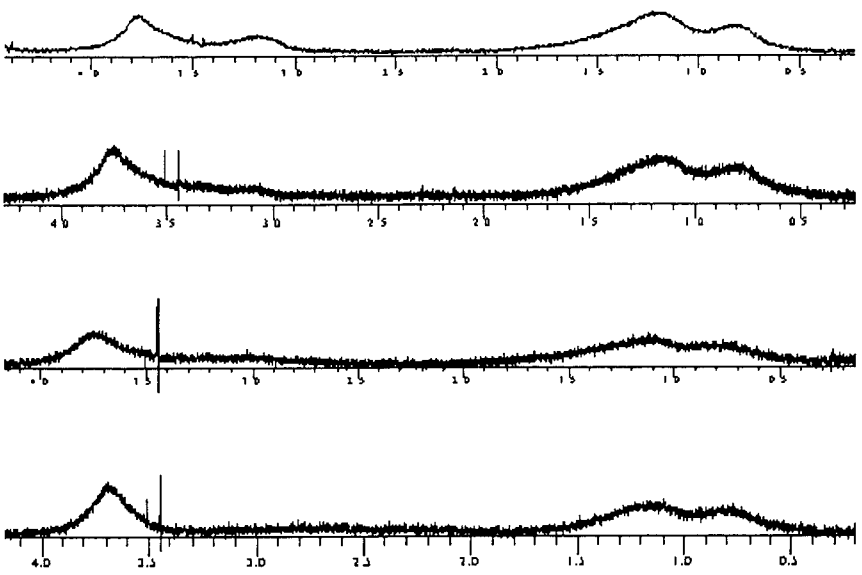


Figura 7.25 Espectros de ^{1}H-RMN de DMPC (14 mM), Pr^{3+} (10mM) e rifampicina (a) 16 mM, (b) 60 mM, (c) 120 mM e (d) 210 mM.

As concentrações dos fármacos, necessárias para a união dos sinais, encontram-se representadas na Tabela 7.10, para uma concentração de praseodímio de 10 mM.

A concentração de rifampicina necessária à união dos picos é de 210 μM e bastante inferior à concentração dos restantes fármacos. Este facto é indicativo de uma interacção mais forte da rifampicina a nível cabeças fosfolipídicos, o que está de acordo com o seu coeficiente de partição e com os estudos de localização realizados por espectrofluorimetria com sondas de localização membranar definida.

Relativamente à grepafloxacina, clordiazepóxido e isoniazida são necessárias concentrações mais elevadas para que ocorra novamente a união dos picos.

Não foi possível o cálculo da concentração de griseofulvina necessária à reversão do efeito do praseodímio dada a sua reduzida solubilidade em água.

Tabela 7.10 Concentrações dos fármacos necessárias para a união dos sinais referentes ao grupo colina das moléculas fosfolipídicas.

DMPC-Pr^{3+}	Rifampicina	Grepafloxacina	Clordiazepóxido	Isoniazida
	210,0 μM	1,0 mM	2,8 mM	290,0 mM

A eficiência relativa dos fármacos para alterar Δppm pode ser descrita através de uma relação linear definida por $\Delta ppm = D - P.C$ (Betageri, G.V. *et al.*, 1989), sendo *C* a concentração dos fármacos, *D* a média de *Δppm* para uma concentração de Pr^{3+} de 10 mM na ausência dos fármacos, *P* é a constante de deslocamento (declive das rectas).

Na Tabela 7.11 encontram-se os parâmetros obtidos para os fármacos em estudo. Os resultados permitem concluir que é a rifampicina que apresenta maior tendência para deslocar o praseodímio dos lipossomas de DMPC, enquanto os restantes fármacos têm um efeito mais reduzido.

Tabela 7.11 Análise das regressões lineares de Dppm referentes aos sinais externo e interno do grupo colina em função da concentração dos fármacos. Os ensaios foram realizados para um número de amostras igual ou superior a 5.

Fármacos	**-P** (declive)	**D** (ordenada na origem)	**r** (coeficiente de correlação)
Rifampicina	1354,73	0,64	-0,901
Grepafloxacina	346,32	0,77	-0,931
Clordiazepóxido	222,86	0,73	-0,996
Isoniazida	1,10	0,74	-0,932

É possível concluir que o deslocamento do Pr^{3+} da superfície membranar pelos fármacos está relacionado com a sua interacção ao nível dos grupos fosfolipídicos, podendo ocorrer quer no caso de existir penetração membranar, quer na presença de moléculas com

determinada orientação à superfície membranar sem que existam quaisquer ligações estéricas (Betageri, G.V. *et al.*, 1989).

Embora a concentração de clordiazepóxido necessária à união dos picos seja ligeiramente superior à concentração da grepafloxacina verifica-se, pela análise dos resultados referentes às regressões lineares, que o clordiazepóxido possui uma constante de deslocamento superior, facto que está de acordo com os coeficientes de partição dos dois fármacos anteriormente calculados.

3 Conclusões finais

Os resultados obtidos sobre a localização dos diferentes fármacos são concordantes para as várias técnicas experimentais utilizadas.

A localização dos fármacos estudados nas membranas lipossómicas de DMPC e DMPG pode ser sumariada da seguinte maneira:

Grepafloxacina: parece estar localizada próximo das cabeças fosfolipídicas, em zonas moderadamente hidrofóbicas das membranas. Os resultados de anisotropia revelam, no entanto, que a grepafloxacina em DMPG deverá encontrar-se a uma maior profundidade membranar, visto ocorrer alteração da anisotropia de fluorescência da sonda TMA-DPH localizada a cerca de 10,9 Å do centro da bicamada.

Griseofulvina: encontra-se localizada em zonas das membranas cuja acessibilidade aos iões de iodeto é praticamente nula. Em DMPG, contudo, deverá posicionar-se a uma maior profundidade visto alterar a anisotropia da sonda TMA-DPH e da sonda DPH localizada a 7,8 Å do centro da bicamada membranar.

Isoniazida: apresenta uma localização muito superficial, devendo estar integrada numa região hidrofílica dos sistemas membranares.

Clordiazepóxido: apresenta-se, em DMPC, localizado numa região hidrofóbica, próximo da sonda 12-AS (7Å do centro da bicamada). Em DMPG adquire uma posição mais superficial, localizando-se entre as sondas 2-AS e 12-AS.

Rifampicina: em DMPC a rifampicina apresenta-se integrada na membrana numa localização equidistante das sondas 2-AS e 12-AS, promovendo a extinção total de fluorescência das sondas DPH e TMA-DPH. Por outro lado, em DMPG parece ter uma localização superficial cerca da interface da membrana.

Os resultados de RMN confirmam os obtidos por fluorescência e permitem concluir que, de uma maneira geral, a maior ou menor penetração dos fármacos nestes sistemas lipossómicos depende principalmente da relação entre as características electrostáticas/ hidrofóbicas dos fármacos e das características electrostáticas dos sistemas hidrofóbicos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Do trabalho realizado para a execução da presente dissertação são apresentadas algumas considerações finais, que não são mais que um súmulo das conclusões apresentadas no final de cada capítulo.

Como o principal objectivo deste trabalho se centra no estudo da interacção de alguns fármacos com vesículas lipossómicas, bem como a sua localização membranar, passam a enumerar-se as conclusões que se julgam mais significativas.

O primeiro passo para a obtenção de informações sobre as interacções moleculares existentes entre fármacos e vesículas lipossómicas, neste caso particular vesículas de DMPC e DMPG, consistiu na determinação do diâmetro dos lipossomas na ausência e presença dos fármacos, não se tendo observado qualquer alteração significativa, bem como na análise do potencial-zeta. Seguiu-se a determinação dos coeficientes de partição lipossomas/solução aquosa (tampão Hepes) através (1) de um método de ultrafiltração envolvendo a separação de fases e quantificação dos fármacos em ambas as fases, (2) de uma técnica de espectrofotometria derivativa de UV-Vis e (3) de espectroscopia de fluorescência. Obtiveram-se resultados idênticos ,a menos do erro experimental, pelo que os valores de K_p podem ser considerados precisos e exactos.

Analisando os resultados para cada um dos fármacos estudados é possível verificar que, relativamente ao clordiazepóxido e à isoniazida os valores de K_p determinados são praticamente independentes do tipo de lípido utilizado, o que poderá advir do facto de serem fármacos neutros a pH 7,4, pelo que as interacções membranares devem ser maioritariamente de carácter hidrofóbico. Por outro lado, os valores de K_p obtidos para o

clordiazepóxido são superiores aos da isoniazida, o que está de acordo com as eficácias de encapsulação em vesículas de DMPC, calculadas pelo método se separação de fases, cujo resultado para o clordiazepóxido é 42,41% comparativamente aos 8,21% da isoniazida.

No que respeita à rifampicina, à dibucaína, à norfloxacina e à grepafloxacina, que se encontram ionizadas a pH 7,4, as interacções esperadas com os fosfolípidos são de natureza não só hidrofóbica, como também electrostática. Assim, a rifampicina que apresenta metade das suas moléculas na forma aniónica a pH fisiológico, tem um coeficiente de partição muito superior em DMPC, visto existirem repulsões electrostáticas com as vesículas de DMPG carregadas negativamente. Por outro lado, a dibucaína apresenta-se maioritariamente na forma catiónica a pH 7,4 o que justifica o maior valor de K_p em ao DMPG, resultante das atracções electrostáticas observadas.

Quanto às fluoroquinolonas estudadas e atendendo à diferença das suas constantes de acidez, nomeadamente do pK_{a1}, verifica-se também uma maior partição em DMPG, pois a pH fisiológico cerca de 25% da grepafloxacina e 10 % da norfloxacina encontram-se na forma catiónica, o que se traduz num coeficiente de partição em DMPG superior ao determinado em DMPC mais uma vez, resultante das atracções electrostáticas observadas ao nível das cabeças polares fosfolipídicas. Verifica-se também que o K_p da norfloxacina é consideravelmente inferior ao da grepafloxacina em DMPC, o que pode resultar da existência de dois grupos metilo nos aneis heterocíclico e piperazínico da grepafloxacina, responsáveis por um incremento das características hidrofóbicas do fármaco.

A griseofulvina, embora sendo um fármaco com características hidrofóbicas sem características ácido/base, tem um coeficiente de partição maior em DMPG do que em DMPC. Tal resultado está de acordo com os valores de potencial-zeta dos lípidos na presença da griseofulvina cuja alteração, mais acentuada no caso do DMPG e praticamente inexistente no DMPC, revela uma maior interacção do fármaco com o lípido negativo.

A utilização de lipossomas, tendo como principal objectivo a modelização do comportamento das membranas biológicas e a elaboração de novas formulações terapêuticas, requer então a obtenção de coeficientes de partição capazes de prenunciar a partição dos fármacos nas membranas celulares, ultrapassando as lacunas inerentes à utilização de sistemas isotrópicos de dois solventes tais como os de *n*-octanol/água. É possível, deste modo, verificar que só relativamente aos fármacos neutros existe uma certa relação entre os K_p e os $K_{a/o}$, o que impossibilita, em muitos casos, uma aproximação à realidade biológica.

Relativamente à localização dos fármacos nas vesículas lipossómicas efectuaram-se estudos de espectroscopia de fluorescência e de ^{1}HRMN utilizando, neste último caso, um lantanídeo como agente de deslocamento dos sinais correspondentes aos protões dos grupos trimetilamónio das moléculas de DMPC, localizados na superfície externa e interna da bicamada membranar das vesículas fosfolipídicas. Os estudos de espectroscopia de fluorescência englobam não só ensaios de extinção de fluorescência, utilizando o ião iodeto como agente de extinção no caso dos fármacos fluorescentes e sondas da série *n*-AS para fármacos não fluorescentes, mas também estudos de anisotropia de fluorescência, utilizando as sondas DPH e TMA-DPH.

No caso da grepafloxacina (fluorescente), os ensaios de extinção de fluorescência efectuados na presença de ião iodeto, sugerem a penetração do fármaco na membrana até zonas moderadamente hidrofóbicas, onde é pequena ou nula a acessibilidade dos iões de iodeto, principalmente em DMPG onde é superior o coeficiente de partição. Neste caso, pensa-se que o mecanismo de penetração membranar inclui, numa primeira fase, a adsorção electrostática e/ou o estabelecimento de ligações de hidrogénio na região da interface membranar, seguida do aparecimento de um gradiente de concentrações através da membrana por difusão passiva. Os ensaios de anisotropia revelaram a inexistência de variação da anisotropia das sondas DPH e TMA-DPH e da T_m em DMPC no entanto, em

DMPG, a incorporação de grepafloxacina alterou os valores da anisotropia da sonda TMA-DPH no intervalo de temperaturas acima de T_m, o que indica uma certa interacção do fármaco com a sonda, possivelmente numa região cuja distância ao centro da bicamada membranar rondará aproximadamente os 11Å, visto não se observar qualquer alteração relativamente ao DPH. Por seu lado, os estudos de RMN permitiram demonstrar uma interacção acentuada da grepafloxacina com os grupos polares fosfolipídicos, bastando uma concentração de 1mM para anular o deslocamento causado pelo praseodímio e a união dos picos referentes aos grupos polares fosfolipídicos.

Quanto à griseofulvina (fluorescente), verifica-se uma diminuição da extinção de fluorescência pelo do ião iodeto, tanto em DMPC como em DMPG, o que permite concluir que, também neste caso, o fármaco se localiza em zonas inacessíveis ao agente de extinção. Em DMPG a variação da extinção de fluorescência é maior, como seria de esperar atendendo ao coeficiente de partição do fármaco, indicando uma localização mais profunda na bicamada fosfolipídica. Esta observação é comprovada pelos estudos de anisotropia, onde se observa alteração da T_m do DMPG na presença do fármaco, bem como a alteração da anisotropia das sondas DPH e TMA-DPH, revelando alteração da fluidez membranar. Em DMPC pensa-se que o fármaco se deverá manter numa região mais superficial visto não ocorrer variação da anisotropia das sondas DPH e TMA-DPH.

Relativamente à isoniazida (não fluorescente), cujos coeficientes de partição em DMPC e DMPG são pequenos, os estudos de extinção de fluorescência efectuados demonstraram uma total inacessibilidade do fármaco relativamente às sondas 2-AS e 12-AS em DMPC e em DPMG, indicando uma localização superficial em ambos os casos. Este facto foi comprovado pelos ensaios de anisotropia de fluorescência, onde não se verificou variação de T_m nem qualquer alteração da anisotropia das sondas DPH e TMA-DPH, bem como pelos ensaios de RMN onde, só com concentrações da ordem dos 290 mM, foi possível observar união dos picos referentes aos grupos polares fosfolipídicos.

O clordiazepóxido, embora com coeficientes de partição idênticos em DMPC e DMPG, parece localizar-se em regiões vesiculares distintas nos dois sistemas. Analisando os resultados é possível concluir que em DMPC o fármaco apresenta uma localização na região hidrofóbica da membrana, dado ocorrer uma extinção de fluorescência mais eficiente da sonda 12-AS e alteração da anisotropia das sondas TMA-DPH e DPH. Por outro lado, em DMPG, os estudos de extinção de fluorescência indicaram uma localização mais superficial, numa região intermédia entre as sondas 2-AS e 12-AS, não ocorrendo alteração da anisotropia do TMA-DPH nem do DPH, o que poderá estar relacionado a menor acessibilidade do fármaco às regiões mais profundas da membrana de DMPG devido, provavelmente, ao maior empacotamento das cadeias hidrocarbonadas membranares.

Finalmente, a rifampicina apresenta em DMPC uma localização numa região equidistante das sondas 2-AS e 12-AS, conduzindo à extinção praticamente total da fluorescência das sondas TMA-DPH e DPH. Os ensaios de RMN revelaram uma forte interacção ao nível dos grupos colina da molécula do DMPC, bastando uma concentração de fármaco de 210 μM para ocorrer o deslocamento do praseodímio da membrana. Em DMPG, onde é baixo o coeficiente de partição, a sua penetração membranar é reduzida, provavelmente devido a repulsões electrostáticas, localizando-se o fármaco à superfície e próximo da interface membranar.

Fazendo um resumo geral dos resultados obtidos para os diferentes fármacos, é possível concluir que a sua interacção com os sistemas lipossómicos estudados depende principalmente da relação entre as características electrostáticas/hidrofóbicas dos fármacos e das características electrostáticas dos lípidos. Assim, o mecanismo de interacção de fármacos neutros, como a isoniazida e o clordiazepóxido, com as membranas baseia-se sobretudo nas suas características de hidrofobicidade verificando-se que relativamente à isoniazida, um fármaco hidrofílico, os coeficientes de partição em DMPC e DMPG são pequenos, apresentando-se localizada à superfície das vesículas. O clordiazepóxido, por

outro lado, sendo mais hidrofóbico, apresenta valores de K_p mais elevados e uma penetração nas membranas que resulta numa localização aos nível das caudas hidrocarbonadas fosfolipídicas.

Relativamente aos fármacos ionizados, como as fluoroquinolonas e a rifampicina, os processos de interacção com as vesículas fosfolipídicas baseiam-se, sobretudo, em interacções electrostáticas. Deste modo, estando as fluoroquinolonas parcialmente ionizadas e com carga positiva a pH fisiológico, a sua interacção com as vesículas de DMPG é consideravelmente superior à verificada em DMPC, como o demonstram os coeficientes de partição e os estudos de localização. Por outro lado, a rifampicina, que se encontra carregada negativamente, apresenta uma maior partição em DMPC e uma localização em regiões mais profundas da membrana, o que não se verifica em DMPG devido, provavelmente, a repulsões electrostáticas fármaco-lípido que impedem a uma maior incorporação nas vesículas lipossómicas.

A Bibliografia

BIBLIOGRAFIA

Ahmed, A.M.S., Farah, F.H., Kellaway, I.W. 1985. The thermodynamics of partitioning of phenothiazines between phosphate buffer and the lipid phases of cyclohexane, n-octanol and DMPC liposomes. *Pharm. Res.*, 1: 119-124.

Ala-Korpela, M., Oja, J., Lounila, L., Jokisaari, J., Savolainen, M.J., Kesaniemi, Y.A. 1995.Structural changes of lipoprotein lipids by ^{1}H-NMR. *Chemical Physics Letters*, 242: 95-100.

Alderighi, L., Gans, P., Ienco, A., Peters, D., Sabatini, A., Vacca, A. 1999. Hyperquad simulation and speciation (HySS): a utility program for the investigation of equilibria involving soluble and partially soluble species. *Coordination Chemistry Reviews*, 184: 311-318.

Anglada, R.R. 1997. Microbiología Sanitaria y Clínica. Editorial Sintesis, Madrid.

Antunes-Madeira, M.C., Madeira, V.M.C., 1987. Partition of Malathion in synthetic and native membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 901: 61-66.

Antunes-Madeira, M.C., Madeira, V.M. C., 1989. Membrane fluidity as affected by the insecticide lindane. *Biochimica et Biophysica Acta*, 982: 161-166.

Aoyanna, H., Sato, K., Kato, T., Hirai, K., Mitsuashi, S. 1987. *Antimicrob Agents Chemotherapy*, 31: 1640-1641.

Arrowsmith, M., Hadgraft, J., Kellaway, I.W. 1983. Thermodynamics of steroid partitioning in DMPC liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 750: 149-156.

Bangham, A.D., Standish, M.M., Watkins, J.C., 1965. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Molecular Biology*, 13: 238-252.

Bangham, A.D., Standish, M.M., Weissmann, G. 1965a. The action of steroids and streptolysin S on the permeability of phospholipid structures to cations. *J. Mol. Biol.*, 13: 253-259.

Bañuelos, S., Arrondo, J.L.R., Canaves, J.M., Ferragut, J.A., Muga, A., 1993. The interaction of daunomycin with model membranes - Effect of the lipid physical state and the lipid composition. *Eur. J. Biochem.*, 213: 1269-1275.

Barbosa, C.M.G., 1995. Desenvolvimento e caracterização de formulações lipossómicas de monofosfato de vidarabina para o tratamento da hepatite B crónica. Dissertação de Doutoramento. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Bauerle, T., Seelig, J., 1991. Interaction of charged and uncharged calcium channel antagonists with phospholipid membranes. Binding equilibrium, binding enthalpy and membrane location. *Biochemistry*, 30: 7203-7211.

Bedard, J., Bryan, L.E. 1989. Interaction of the Fluoroquinolone Antimicrobial Agents Ciprofloxacin and Enoxacin with Liposomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33: 1379-1382.

Bermudez, L.E. 1994. Use of liposome preparation to treat mycobabterial infections. *Immunobiology*, 191: 578-583.

Betageri, G.V., Rogers, J.A. 1987. Thermodynamics of partition of b-blockers in the n-octanol/buffer and liposome systems. *International Journal of Pharm.*, 36: 165-173.

Betageri, G.V., Theriault, Y., Rogers, J.A. 1989. NMR Study of the Interaction of Beta-Blockers with Sonicated DMPC Liposomes in the Presence of Praseodymium Cation. *Membrane Biochemistry*, 8: 197-206.

Betageri, G.V., Dipali, S. R. 1993. Partitioning and thermodynamics of dipyridamole in the n-octanol/ buffer and liposome systems. *J.Pharm. Pharmacol.*, 45: 931-933.

Bystrov, V.F., Dubrovina, N.I., Barsukov, L.I., Bergelson, L.D. 1971. NMR differentiation of the internal and external phospholipid membrane surfaces using paramagnetic Mn^{2+} and Eu^{3+} ions. *Chem. Phys. Lipids*, 6: 343-350.

Bystrov, V.F., Shapiro, Yu.E., Viktorov, A.V., Barsukov, L.I., Bergelson, L.D. 1972. ^{31}P-NMR signals from inner and outer surfaces of phospholipid membranes. *Febs Letters*, 25: 337-338.

Blatt, E., Ghiggino, K.P. 1981. A novel means of investigating the polarity gradient in the micelle sodium lauryl sulphate using a series of n-(9-anthroyloxy) fatty acids as fluorescent probes. *J. Chem. Soc.*, 77: 2551-2558.

Blatt, E., Sawyer, W.H., 1985. Depth-dependent fluorescent quenching in micelles and membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 822: 43-62.

Boggs, J.M., 1987. Lipid intermolecular hydrogen bonding: influence on structural organization and membrane function. *Biochimica et Biophysica Acta*, 906: 353-404.

Bonev, B.B., Chan, W.C., Bycroft, B.W., Roberts, G.C.K., Watts, A. 2000. Interaction of the lantibiotic Nisin with mixed lipid bilayers: a ^{31}P and ^{2}H NMR study. *Biochemistry*, 39: 11425-11433.

Braun R.D. 1987. Introduction to Instrumental analysis, McGraw-Hill International Editions, New York.

Cabrini, G., Verkman, A.S. 1986. Localization of cyanine dye binding to brush-border membranes by quenching of n-(9-anthroyloxy) fatty acid probes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 862: 285-293.

Cantor & Schimmel, 1980. *Biophysical Chemistry. Part II.* W.H. Fresman and Company, New York.

Carrera, I., Martorell, C., Freixas, J., Hernández-Borrell, J. 1993. Influence of one quinolone on the formation and the physical stability of liposomes. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 19: 1709-1721.

Castanho, M., Prieto, M., Acuña, A. U. 1996. The transverse location of fluorescence probe trans-parinaric acid in lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1279: 164-168.

Castile, J.D., Taylor, K.M.G., 1999. Factors affecting the size distribution of liposomes produced by freeze-thaw extrusion. *International Journal of Pharmaceutics*, 188: 87-95.

Castro, B., Gameiro, P., Lima, C. 1993. Determination of the pKa values of sparingly soluble substancies in water revisited: application to some benzodiazepines. *Analytica Chimica Acta*, 281: 53-62.

Chalpin, D.B., Kleinfeld, A.M., 1983. Interaction of fluorescence quenchers with the n-(9-anthroyloxy) fatty acid membrane probes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 731: 465-474.

Chorev, M., Gurrath, M., Behar, V., Mammi, S., Tonello, A., Peggion, E., 1995. Conformation and interactions of bombolitin I analogues with SDS micelles and phospholipid vesicles: CD, fluorescence, two-dimensional NMR and computer simulations. *Biopolymers*, 36: 473-484.

Connors, K.A., 1987. Binding Constants: The measuremente of molecular complex stability. Wiley, New York.

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. *European Journal of Biochemistry*, 189: 387-393.

Coutinho, A., Prieto, M., 1993. Ribonuclease T1 and Alcohol Dehydrogenase Fluorescence Quenching by Acrylamide. *Journal of Chemical Education*, 70: 425-428.

Coutinho, A., Prieto, M., 1995. Self-association of the polyene antibiotic nystatin in dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles: a time-resolved fluorescence study. *Biophysical Journal*, 69: 2541-2557.

Cruz, M.E.M., 1999. Lipossomas: vesículas mágicas ou simples utopia ? *Boletim de Biotecnologia*, 3-16.

Cullis, P.R., Hope, M.J., Bally, M.B., Madden, T.D., Mayer, L.D., Janoff, A.S. 1987. "Liposomes as Pharmaceuticals" In : Liposomes: From biophysics to therapeutics. (Ostro, M.J.Ed.), Marcel Dekker, New York.

Deol, P., Khuller, G.K., Joshi, K. 1997. Therapeutic efficacies of isoniazide and rifampin encapsulated in lung-specific stealth liposomes against *Mycobacterium tuberculosis* infection induced in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41: 1211-1214.

Di Giulio, A., Maurizi, G., Saletti, M.A., Amicosante, G., Mazzeo, P., Oratore, A. 1989. The ultraviolet derivative spectrophotometric determination of neutral liposome-entrapped β-lactam antibiotics, *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, 7: 1159-1164.

Dipali, S.R., Kulkarni, S.B., Betageri, G.V. 1996. Comparative study of separation of non-encapsulated drug from unilamellar liposomes by various methods. *J. Pharm. Pharmacol.*, 48: 1112-1115.

Dong-Sun L., Hee-Jung H., Kun K., Won-Bong P., Jung-Kil C., Jae-Hyun K. 1994. Dissociation and complexation of fluoroquinolone analogues. *J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 12: 157-164.

Drakopoulos, A.I., Ioannou, P.C. 1997. Spectrofluorimetric study of the acid-base equilibria and complexation behavior of the fluoroquinolone antibiotics ofloxacin, norfloxacin, ciprofloxacina and pefloxacin in aqueous solution. *Analytica Chimica Acta*, 354: 197-204.

Efthymiopoulos, C. 1997. Pharmacokinetics of Grepafloxacin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 40: 35-43.

Eisinger, J., Flores, J., 1983. Cytosol-membrane interface of human erythrocytes. *Biophys. Journal*, 41: 367-379.

Fato, R., Battino, M., Esposti, M.D., Castelli, G.P., Lenaz, G., 1986. Determination of partition and lateral diffusion coefficients of ubiquinones by fluorescence quenching of n-(9-anthroyloxy) stearic acids in phospholipid vesicles and mitochondrial membranes. *Biochemistry*, 25: 3378-3390.

Ferreira, H.M.N. 1991. Quinolonas. Trabalho elaborado para efeito da realização de "Provas de aptidão pedagógica e capacidade científica", Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Foye, W.O., 1989. Principles of Medicinal Chemistry. Third edition, Boston.

Frisken, B.J., Asman, C., Patty, P.J., 2000. Studies of vesicle extrusion. *Langmuir*, 16: 928-933.

Gameiro, P., Reis, S., Lima, J.L.F.C., de Castro, B. 2000. Calibration of pH glass electrodes by direct strong acid/strong base titrations under dilute conditions. *Analytica Chemica Acta*, 405: 167-172.

Gans, P., Sabatini, A., Vacca, A. 1985. SUPERQUAD: An improved general program for computation of formation constants from potentiometric data. *J. Chem. Soc.* Dalton Trans., 1195-1200.

Gans, P., Sabatini, A., Vacca, A. 1996. Investigation of equilibria in solution. Determination of equilibrium constants with the HYPERQUAD suite of programs. *Talanta*, 43: 1739-1753.

Garcia, D.A., Perillo, M.A. 1997. Partitioning of flunitrazepan into model membranes studied by temperature controlled gel filtration chromatography. *Biomedical Chromatography*, 11: 343-347.

Garrett, J., Osswald, W. 1987. Terapêutica Medicamentosa e suas bases Farmacológicas, II Volume, 2ª Edição, Porto Editora.

Garrison, M.D., Doh, L.M., Potts, R.O., Abraham, W. 1994. Fluorescence spectroscopy of 9-anthroyloxy fatty acids in solvents. *Chemistry and Physics of Lipids*, 70: 155-162.

Ghosh, A. K., Mukherjee, J., Basu, R., Chatterjee, M., Nandy, P., 1993. A fluorescence anisotropy study of stabilizing effect of tri- and tetra- nitrovasodilatory drugs on DPPC liposomal membrane. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1153: 20-22.

Goodman Gilman, A., Rall, T.W., Niles, A.S., Taylor, P. 1990. Goodman and Gilman`s. The Pharmacological basis of Therapeutics. Eighth Edition. Pergamon Press.

Gregoriadis, G. ,1976. The carrier potential of liposomes in biology and medicine. *New England J. Med.*, 295: 765-770.

Gregoriadis, G., 2001. Drug and vaccine delivery systems. *Drug Delivery*, 172-176.

Grieser, F., Drummond, C.J. 1988. The Physicochemical Properties of Self-Assembled Surfactant Aggregates As Determined by Some Molecular Spectroscopic Probe Techniques. *The Journal of Physical Chemistry*, 92: 5580-5593.

Griffiths, T.R., King, K., Hubbard, H.V. 1982. Some aspects of the scope and limitations of derivative spectroscopy. *Anal. Chimica Acta*, 143: 163-176.

Gücer, N., Ebel, J., Gröning, R. 1993. Encapsulation of drugs and excipients in liposomes-measurements with drug-specific electrodes. *Pharm. Acta Helv.*, 68: 129-133.

Gulati, M., Grover, M., Singh, S., Singh, M. 1998. Lipophilic drug derivatives in liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 165: 129-168.

Gürsoy, A., Senyucel, B. 1997. Characterization of ciprofloxacin liposomes: derivative ultraviolet spectrophotometric determinations. *J. Microencapsulation*,14: 769-776.

Hackmann, E.R.M., Beneton, S.A., Santoro, M.I., 1991. Espectrofotometria derivada na análise de fármacos em medicamentos. *Revista Portuguesa de Farmácia*, 41: 7-13.

Hardy, D., Amsterdam, D., Mandell, L.A., Rotstein, C. 2000. Comparative in vitro activities of ciprofloxacin, gemifloxacin, grepafloxacin, moxifloxacin, ofloxacin, sparfloxacin, trovafloxacin and other antimicrobial agents against bloodstream isolates of gram-positive cocci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44: 802-805.

Hasegawa, T., Ushiroda, Y., Kawaguchi, M., Kitazawa, Y., Nishiyama, M., Hiraoka, A., Nishijo, J. 1996. UV Absorption spectroscopic analysis of the molecular orientation of a drug penetrated into a DPPC membrane. *Langmuir*, 12: 1566-1571.

Hauser, H., Penkett, S.A., Chapman, D. 1969. Nuclear magnetic resonance spectroscopic studies of procaine hydrochloride and tetracaine hydrochloride at lipid-water interfaces. *Biochimica et Biophysica Acta*, 183: 466-475.

Herbette, L., Katz, A.M., Sturtevant, J.M. 1983. Comparisions of the interaction of propranolol and timolol with model and biological membrane systems. *Molecular Pharmacology*, 24: 259-269.

Herbette, L.G., Trumbore, M., Chester, D.W., Katz, A.M. 1988. Possible molecular basis for the pharmacokinetics and pharmacodynamics of three membrane-active drugs: propanolol, nimodipine and amiodarone. *J. Mol. Cell Cardiol.*, 20: 373-378.

Hope, M.J., Bally, M.B., Webb, G., Cullis, P.R. 1985. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Caracterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochimica et Biophysica Acta*, 812: 55-65.

Hope, M.J., Bally, M.B., Mayer, L.D., Janoff, A.S., Cullis, P.R., 1986. Generation of multilamellar and unilamellar phospholipid vesicles. Chemistry and Physics of Lipids, 40: 89-107.

Hoshino, M., Imamura, M., Ikehara, K., Hama, Y. 1981. Fluorescence enhancement of benzene derivatives by forming inclusion complexes with β-cyclodextrin in aqueous solutions. *J. Phys. Chem.*, 85: 1820-1823.

Huang, Z., Epand, R.M. 1997. Study of the phase behaviour of fully hydrated saturated diacyl phosphatidylserine/fatty acid mixtures with ^{31}P-NMR and calorimetry. *Chemistry and Physics of Lipids*, 86: 161-169.

Ikeda, T., Tazuke, S., Watanabe, M. 1983. Interaction of biologically active molecules with phospholipid membranes. Fluorescence depolarization studies on the effect of polymeric biocide bearing biguanide groups in the main chain. *Biochimica et Biophysica Acta*, 735: 380-386.

Interunion Comission on Biothermodynamics 1976. Recomendations for Measurements and presentation of Biochemical Equilibrium Data. *The Journal of Biological Chemistry*, 251.

Irma, A.J.M., Bakker-Woudenberg, M.T.K., Storm, G., Etten, E.W.M. 1998. Administration of liposomal agents and the phagocytic function of the mononuclear phagocyte system. *International Journal of Pharmaceutics*, 162: 5-10.

Jemiola-Rzeminska, M., Kruk, J., Skowronek, M., Strzalka, K. 1996. Location of ubiquinone homologues in liposome membranes studied by fluorescence anisotropy of diphenylhexatriene and trimethylammonium-diphenyl-hexatriene. *Chemistry and Physics of Lipids*, 79: 55-63.

Jones, M.N., Chapman D., 1995. Micelles, monolayers and biomembranes. Wiley-Liss Inc., New York.

Kaiser, R.D., London, E., 1998. Location of diphenylhexatriene (DPH) and its derivatives within membranes: comparision of different fluorescence quenching analyses of membrane depth. *Biochemistry*, 37: 8180-8190.

Karczmar, G.S., Tritton, T.R., 1979. The interaction of adriamycin with small unilamellar vesicle liposomes. A fluorescence study. *Biochimica et Biophysica Acta*, 557: 306-319.

Katragadda, A., Bridgman, R., Betageri, G., 2000. Effect of liposome composition and cholesterol on the cellular uptake of stavudine by human monocyte/macrophages. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 5: 483-493.

Kitamura, K., Takenaka, M., Yoshida, S., Ito, M., Nakamura, Y., Hozumi, K., 1991. Determination of dissociation constants of sparingly soluble phenothiazine derivatives by second-derivative spectrophotometry. *Analytica Chimica Acta*, 242: 131-135.

Kitamura, K., Imayoshi, N., 1992. Second derivative spectrophotometric determination of the binding constant between chlorpromazine and β-cyclodextrin in aqueous solutions. *Analytical Sciences*, 8: 497-501.

Kitamura, K., Imayoshi, N., Goto, T., Shiro, H., Mano, T., Nakai, Y., 1995. Second derivative spectrophotometric determination of partition coefficients of chorpromazine and promazine between lecithin bilayer vesicles and water. *Analytica Chimica Acta*, 304: 101-106.

Korolkovas, A., Burckhalter, J.H. 1988. Química Farmacêutica. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro.

Kubinyi, H., 1995. The quantitative analysis of structure-activity relationship: M.E. Wolff (Ed.) Burger's medicinal chemistry and drug discovery,1, John Wiley & Sons, New York, p. 497- 571.

Lakowicz, J.R., 1999. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Second edition. Keuwer Academic/ Plenum Publishers, New York.

Lasic, D.D., 1993. Liposomes-from Physics to Applications. Elsevier, Amsterdam.

Lee, D., Han, H., Kin, K., Park, W., Cho, J., Kim, J. 1994. Dissociation and Complexation of Fluoroquinolone Analogues. *J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 12: 157-164.

Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M. 2000. Biochemistry. The molecular basis of cell structure and function. Third edition, New York.

Leporati E., 1989. The Determination of stability constants. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1295

Levine,Y.K., Lee, A.G., Birdsall, N.J.M., Metcalfe, J.C., Robinson, J.D. 1973. The interaction of paramagnetic ions and spin labels with lecithin bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 291: 592-607.

Lopes, A.M.G., 1997. Partição de xenobióticos orgânicos em agregados anfifílicos. Uma proposta de novos previsores de bioconcentração. Dissertação de Doutoramento. Instituto de Tecnologia Química e Biológica. Universidade Nova de Lisboa.

Loura, L.M.S., Fodorov, A., Prieto, M., 2001. Fluid-fluid membrane microheterogeneity: a fluorescence resonance energy transfer study. *Biophysical Journal*, 80: 776-788.

Mayer, L.D., Hope, M.J., Cullis, P.R., Janoff, A.S., 1985. Solute distribution and trapping efficiencies observed in freeze-thawed multilamellar vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 817: 193-196.

Mayer, L.D., Bally, M.B., Hope, M.J., Cullis, P.R., 1986. Techniques for encapsulation bioactive agents into liposomes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 40: 333-345.

Mandell, G.L., Sande, M.A. 1989. Drugs used in the Chemotherapy of Tuberculosis and Leprosy. Chapter 49. Martindale, The extra Pharmacopoeia, Twenty-ninth Edition. London, The Pharmaceutical Press. Edited by James E.F. Reynolds.

Marsh, D., 1990. CRC Handbook of Lipid Bilayers. CRC Press, Boca Raton, Florida.

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. *Journal of Medicinal Chemistry*, 34: 869-877.

Matayoshi, E.D., Kleinfeld, A. M., 1981. Emission wavelength - dependent decay of the 9-anthroyloxy-fatty acid membrane probes. *Biophys. Journal*, 35: 215-235.

McClare C.W.F., 1971. An accurate and convenient organic phosphorus assay. *Anal. Biochem.* 39: 527-530.

Meylan, W.M., Howard, P.H., 1995. Atom/fragment contribution method for estimating octanol-water partition coefficients. *J.Pharmaceutical Sci.*, 84: 83-92.

Meylan, W.M., Howard, P.H., Boethling, R.S. 1996. Improved method for estimating water solubility from octanol/water partition coefficient. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15: 100-106.

Miyoshi, H., Maeda, H., Tokutake, N., Fujita, T., 1987. Quantitative Analysis of Partition Behavior of Substituted Phenols from Aquous Phase into Liposomes Made of Lecithin and Various Lipids. Bull. *Chem. Jpn.*, 60: 4357-4362.

Miller, C.R., Bondurant, B., McLean, S.D., McGovern, K.A., O'Brien, D.F., 1998. Liposome-Cell Interactions in Vitro: Effect of Liposome Surface Charge on the Binding and Endocytosis of Conventional and Sterically Stabilized Liposomes. *Biochemistry*, 37: 12875-12883.

Miller, J.P., Herbette, L.G., White, R.E., 1996. X-ray diffraction analysis of cytochrome P450 2B4 reconstituted into liposomes. *Biochemistry*, 35: 1466-1474.

Moya-Quiles, M. R., Muñoz, Delgado, E., Vidal, C.J., 1996. Effects of the pyrethroid insecticide permethrin on membrane fluidity. *Chemistry and Physics of Lipids*, 79: 21-28.

Montero, M. T., Carrera, I., Hernandez-Borrell, J. 1994. Encapsulation of a quinolone in liposomes. Location and effect on lipid bilayers. *J. Microencapsulation*, 11: 423-430.

Montero, M. T., Hernàndes-Borrell, J. 1994a. Fluoroquinolone distribution in a phospholipid environment studied by spectrofluorimetry. *Analytica Chimica Acta*, 290: 58-64.

Montero, M.T., Borrell, J.H., Keough, K.M.W. 1998. Fluoroquinolone-Biomembrane interactions: monolayer and calorimetric studies. *Langmuir*, 14: 2451-2454.

Moreno, M. J., Prieto, M. 1993. Interaction of the peptide hormone adrenocorticotropin, ACTH(1-24), with a membrane model system: a fluorescence study. *Photochemistry and Photobiology*, 57: 431-437.

Morrison, R., Boyde, R. 1990. Química Orgânica, 9ª edição. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.

Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Kobayashi, G.S., Pfaller, M.A. 1998. Terceira Edição, Guanabara Koogan.

Mwalupindi, A.G., Rideau, A.; Agbaria, R.A., Warner, I.M., 1994. Influence of organized media on the absorption and fluorescence spectra of auramine-O dye. *Talanta*, 41: 599-609.

Nayar, R., Hope, M.J., Cullis, P.R., 1989. Generation of large unilamellar vesicles from long-chain saturated phosphatidylcholines by extrusion technique. *Biochimica et Biophysica Acta*, 986: 200-206.

Nagano, K., Tsukahara, H., Kinoshita, H., Tamura, Z. 1963. *Chem. Pharm.Bull.*, 2: 797-805.

Nassar, P.M., Almeida, L.E., Tabak, M. 1998. Binding of dipyridamole to DPPG and DPPC phospholipid vesicles:steady-state fluorescence and fluorescence anisotropy decay studies. *Langmuir*, 14: 6811-6817.

Neal, S.L., Villegas, M.M. 1995. Phospholipid Vesicles as Organized Media in Spectroluminescence Analysis. *Anal.Chem.*, 67: 2659-2665.

Neumeyer, J.L., Booth, R.G. 1995. Neuroleptics and Anxiolytic Agents. Principles of Medicinal Chemistry, 4th edition. Philadelphia.

New Antimicrobial Agents approved by the U.S. Food and Drug Administration in 1997 and New Indications for previously approved Agents, 1998. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42: 987-988.

New, R.R.C. 1990. Lipossomes-a pratical approach. Rickwood D., Hames B.D., Eds. IRL Press, Oxford.

Newton, W., Kluza, R.B. 1978. pK_a Values of medicinal compounds in pharmacy practice. *Drug Intelligence and Clinical Pharmacy*, 12: 546-554.

O'Haver, T.C. 1979 Derivative and wavelength modulation spectrometry. *Analytical Chemistry*, 51: 91-100.

Omran, A.A., Kitamura, K., Takegami, S., El-Sayed, A.Y., Mottaleb, M.A. 2001. Determination of partition coefficients of diazepam and flurazepam between phosphatidylcholine bilayer vesicles and water by second derivative spectrophotometric method. *J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 25: 319-324.

Ong, S., Liu, H., Bhat, G., Pidgeon, C., 1995. Membrane partition coefficients chromatographically measured using immobilized artificial membrane surfaces. *Analytical Chemistry*, 67: 755-761.

Orozco, L.C., Quintana, F.O., Beltran, R.M., de Moreno, I, Wasserman, M, Rodriguez, G. 1986. The use of rifampicin and isoniazid entrapped in liposomes forthe treatment of Murin tuberculosis. *Tubercle*, 67: 91-97.

Owen, A.J., 1998. Quantitative UV-visible analysis in the presence of scattering. *Spectroscopy Europe*, 26-28.

Panchagnula, R., Thomas, N.S. 2000. Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research. *International Journal of Pharmaceutics*, 201: 131-150.

Papahadjopoulos, D., Jacobson, K., Poste, G., Shepherd,G., 1975. Effects of local anesthetics on membrane properties. Changes in the fluidity of phospholipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 394: 504-519.

Pedrós, J., Gómez, C.M., Campos, A., Abad, C., 1997. A fluorescence spectroscopy study of the interaction of monocationic quinine with phospholipid vesicles. Effect of the ionic strength and lipid composition. *Spectrochimica Acta Part A*, 53: 2219-2228.

Pfendt, L.B., Sladic, D.M., Janjic, T.J., Popovic, G.V. 1990. Study of heterogenious equilibria in saturated aquous solution of some 7-chloro-1,4-benzodiazepines. *Analyst*, 115: 383-387.

Phonphok, N., Chidichimo, G., Westerman, P. 1996. Disposition of chloroform in phosphatidylcholine membranes: a ^{2}H and ^{31}P NMR study. *Chemistry and Physics of Lipids*, 83: 25-37.

Pinto-Alphandary, H., Andremont, A., Couvreur, P., 2000. Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 13: 155-168.

Pinto, L.M.A., Yokaichiya, D.K., Fraceto, L.F., Paula, E., 2000. Interaction of benzocaine with model membranes. *Biophysical Chemistry*, 87: 213-223.

Pjura, W. J., Kleinfeld, A. M., Karnovsky, M. J., 1984. Partition of Fatty Acids and Fluorescent Fatty Acids into Membranes. *Biochemistry*, 23: 2039-2043.

Pramauro, E., Pelizzetti, E., 1996. Surfactants in analytical chemistry. Applications on organized amphiphilic media. Elsevier, New York.

Prosser, R. S., Volkov, V. B., Shiyanovskaya, I. V. 1998. Solid-state NMR studies of magnetically aligned phospholipid membranes: taming lanthanides for membrane protein studies., *Biochem. Cell Biol.*, 76: 443-451.

Quenelle, D.C., Staas, J.K., Winchester, G.A., Barrow, E. L.W., Barrow, W.W. 1999. Efficacy of microencapsulated rifampicine in Micobacterium tuberculosis-infected mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43: 1144-1151.

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.

Riske, K.A., Nascimento, O.R., Peric, M., Bales, B.L., Lamy-Freund, M.T., 1999. Probing DMPG vesicle surface with a cationic aqueous soluble spin label. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1418: 133-146.

Rogers, J.A., Davis, S.S. 1980. Functional group contributions to the partitioning of phenols between liposomes and water. *Biochimica et Biophysica Acta*, 598: 392-404.

Rojas, F.S., Ojeda, C.B., Pavon, J.M.C., 1988. Derivative ultraviolet-visible region absorption spectrophotometry and its applications. *Talanta*, 35: 753-761.

Rossotti, F.J.C., Rossotti, H. 1985. Potentiometric titrations using gran plots. *J. Chemical Education,* 42: 375-378.

Ruiz-Serrano, M.J., Alcalá, L., Martínez, L., Díaz, M., Marín, M., González-Abad, M.J., Bouza, E. 2000. In vitro activities of six fluoroquinolones against 250 clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis susceptible or resistant to first-line antituberculosis drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44: 2567-2568.

Savitzeky, A., Golay, M.J.E. 1964. Smoothing and differentiation of data. *Anal.Chem.* 36: 1627-1639.

Schreier, S., Frezzatti Jr., W.A., Araujo, P.S., Chaimovich, H., Cuccovia, I.M. 1984. Effect of lipid membranes on the apparent pK of the local anesthetic tetracaine. *Biochimica et Biophysica Acta*, 769: 231-237.

Seelig, A., Allegrini, P. R., Seelig, J. 1988. Partitioning of local anesthetics into membranes: surface charge effects monitored by phospholipids head-group. *Biochem. Biophys. Acta*, 939: 267-276.

Seelig, J., Ganz, P. 1991. Nonclassical hydrophobic effect in membrane binding equilibria. *Biochemistry*, 30: 9354-9359.

Seydel, J.K. 1991. Nuclear magnetic ressonance and differential scanning calorimetry as tools for studying drug-membrane interactions. *TiPS*, 12: 368-371.

Selvin, P.R., 2000. The renaissance of fluorescence resonance energy transfer. *Nature Structural Biology*, 7: 730-734.

Sessa, G., Weissmann, G., 1968. Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. *J. Lipid Res.*, 9: 310-318.

Sharma, A., Sharma, U.S., 1997. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics*, 154: 123-140.

Sikaris, K.A., Sawyer, W.H., 1982. The interaction of local anaesthetics with synthetic phospholipid bilayers. *Biochemical Pharmacology*, 3: 2625-2631.

Singer, M.A., 1977. Interaction of Dibucaine and Propranolol with phospholipid bilayer membranes - effect of alterations in fatty acyl composition. *Biochemical Pharmacology*, 26: 51-57.

Slavic, J., 1994. Fluorescent probes in cellular and molecular biology, Prague, Czech Republic.

Sopkova, J., Gallay, J., Vincent, M., Pancoska, P., Lewit-Bentley, A., 1994. The dynamic behavior of annexin V as a function of calcium ion binding: a circular dichroism, UV absorption, and steady-state and time-resolved fluorescence study. *Biochemistry*, 33: 4490-4499.

Sritharan, M. 1993. Studies on the tissue distribution of liposome-associated clofazimine, an antileprosy drug. *Methods Find Exp.Clin.Pharmacology*, 15: 107-111.

Storm, G. (Ed.), 1987. Liposomes as delivery system for doxorubicin in cancer chemotherapy. Thesis. Rijksuniversiteit te Utrecht, The Netherlands.

Storm, G., Crommelin, D.J.A., 1998. Liposomes: quo vadis?. *PSTT*, 1 No.1.

Sue,M.S., Liu, K.M., Yu, H.S. 1993. The gastro-intestinal absorption of griseofulvin can be enhanced by encapsulation into liposomes. *Kao Hsiung I Hsueh Ko Hsueh Tsa Chin*, 9: 1-8.

Talsky, G., Mayring, L., Kreuzer, H., 1978. High-resolution, high-order UV/VIS derivative spectrophotometry. *Angewandte Chemie*, 17: 785-874.

Talsma H., Steenbergen M.J., Crommelin, D.J.A., 1991. The cryopreservation of liposomes:III Almost complete retention of a water soluble marker in small liposomes in a cryoprotectant containing dispersion after a freezing/thawing cycle. *Int. J. Pharm.*, 77: 119-126.

Takayama, M., Itoh, S., Hagasaki, T., Tanimizu, I., 1977. A new enzimatic method for determination of serum choline-containing phospholipids. *Clinica Chimica Acta*, 79: 93-98.

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. *Biochimica et Biophysica Acta*, 558: 166-178.

Tsyganenko, A.I., Vasil`chenko, V.N., Leont`ev, V.S., Vasil`chenko, N.S., Dedukh, N.V. 1983. Isolation and low-temperature preservation of liposomes containing rifampicin. *Antibiotiki*, 28: 577-581.

Vásquez, J.L., Montero, M.T., Trias, J., Hernàndez-Borrell, J., 1998. 6-Fluoroquinolone - Liposome interactions: Fluorescence quenching study using iodide. *International Journal of Pharmaceutics*, 171: 75-86.

Vásquez, J.L., Monteiro, M.T., Merino, S., Domènech, Ò., Berlanga, M., Viñas, M., Hernández-Borrell, J. 2001.Location and nature of the surface membrane binding site of ciprofloxacin: a fluorescence study. *Langmuir*, 17: 1009-1014.

Vemuri, S., Rhodes, C.T., 1995. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharm. Acta Helv.*, 70: 95-111.

Venema, F.R., Weringa, W.D., 1988. The interactions of phospholipid vesicles with some anti-inflammatory agents. *J. of Colloid and Interface Science*, 125: 484-492.

Villalaín, J., Prieto, M., 1991. Location and interaction of n-(9-anthroyloxy) stearic acid probes incorporated in phosphatidylcholine vesicles. *Chemistry and Physics of Lipids*, 59: 9-16.

Vogel, A.I., 1948. A Text Book of Quantitative Analysis:Theory and Practice, Longmans and Green & CO., London.

Wang, A., Dennis, E.A., 1999. Mammalian lysophospholipases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1439: 1-16.

Wary, C., Bloch, G., Jehenson, P., Carlier, P.G. 1996. C13 NMR spectroscopy of lipids: a simple method for absolute quantitation. *Anticancer Research*, 16: 1479-1484.

Watts el al., 1981. *Biochimica et Biophysica Acta*, 645: 91-96.

Welti, R., Mullikin, L.J., Yoshimina, T., Helmkamp, G.M., 1984. Partition of anphiphilic molecules into phospholipid vesicles and human erythrocyte ghosts: measurements by ultraviolet difference spectroscopy. *Biochemistry*, 23: 6086-6091.

Weltzien, H.V., 1979. Cytolytic and membrane-perturbing properties of lysophosphatidylcholine. *Biochimica et Biophysica Acta*, 559: 259-287.

Wenk, M.R., Fahr, A., Reszka, R., Seelig, J., 1996. Paclitaxel partitioning into lipid bilayers. *Journal of Pharmacutical Sciences*, 85: 228-231.

Wiedemann, B., Heisig, P. 1997. Antibacterial activity of grepafloxacin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 40: 19-25.

Woodle, M.C., Papahadjopoulos D., 1997. Liposome preparation and size characterization. In, Biomembranes. Ed. Lester Packer and Sidney Fleischer, Academic Press.

Wright, S. E., White, J.C., Huang, L., 1990. Partitioning of teniposide into membranes and the role of lipid composition. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1021: 105-113.

Wu, P., Brand, L., 1994. Resonance energy transfer: methods and applications. *Analytical Biochemistry*, 218: 1-13.

Yang, Q., Liu, X., Umetani, K., Ikehara, T., Miyauchi, S., Kamo, N., Jin, T., Miyake, J. 2000. Membrane partitioning and translocation of hydrophobic phosphonium homologues: thermodynamic analysis by immobilized liposome chromatography. *J. Phys. Chem.*, B, 104: 7528-7534.

Zavoico, G.B., Chandler, L., Kutchai, H., 1985. Perturbation of egg phosphatidylcholine and dipalmitoylphosphatidylcholine multilamellar vesicles by n-alkanols. A fluorescent probe study. *Biochimica et Biophysica Acta*, 812: 299-312.