

**FREDDY ALEX ESTEVES**

**LIPOSSOMAS COMO MODELOS BIOMEMBRANARES.  
CORRELAÇÃO ENTRE COEFICIENTES DE PARTIÇÃO  
(LIPOSSOMA/ÁGUA E OCTANOL) E ACTIVIDADE DE  
COMPOSTOS FARMACOLOGICAMENTE ACTIVOS**



**UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PORTO, 2011**



**FREDDY ALEX ESTEVES**

**LIPOSSOMAS COMO MODELOS BIOMEMBRANARES.  
CORRELAÇÃO ENTRE COEFICIENTES DE PARTIÇÃO  
(LIPOSSOMA/ÁGUA E OCTANOL) E ACTIVIDADE DE  
COMPOSTOS FARMACOLOGICAMENTE ACTIVOS**



**UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PORTO, 2011**

**FREDDY ALEX ESTEVES**

**LIPOSSOMAS COMO MODELOS BIOMEMBRANARES.  
CORRELAÇÃO ENTRE COEFICIENTES DE PARTIÇÃO  
(LIPOSSOMA/ÁGUA E OCTANOL) E ACTIVIDADE DE  
COMPOSTOS FARMACOLOGICAMENTE ACTIVOS**

De \_\_\_\_\_

**(Freddy Alex Esteves)**

**Trabalho de Conclusão de Ciclo  
apresentado à Universidade Fernando  
Pessoa como parte dos requisitos para  
obtenção do grau de Mestrado  
Integrado em Ciências Farmacêuticas,  
sob orientação da Professora Doutora  
Carla Matos e co-orientação da  
Professora Doutora Carla Moutinho.**

## Resumo

A absorção e consequente acção terapêutica são questões principais no desenvolvimento de novos fármacos por parte da indústria farmacêutica. Neste sentido, são usados diferentes modelos que simulam as membranas biológicas de forma a prever a absorção dos fármacos. Neste trabalho, são comparados o modelo octanol/água e o modelo lipossoma/água. O trabalho encontra-se dividido em duas partes. Na primeira parte, os dois modelos são descritos e apresentados os principais métodos de determinação do coeficiente de partição. Na segunda parte do trabalho, é apresentada a correlação entre os dois modelos e a correlação entre cada modelo e a absorção. Os parâmetros usados para relacionar os dois modelos foram o coeficiente de distribuição ( $D$ ), para os lipossomas ( $D_{L/A}$ ) e para o octanol ( $D_{O/A}$ ), e a fracção de fármaco absorvido por via oral ( $F_a$ ). Para este estudo, foram retirados de fontes bibliográficas sessenta e seis fármacos, divididos em quatro grupos de acordo com a carga e o grau de ionização. Assim, este trabalho apresenta um grupo de fármacos neutros, um grupo carregado positivamente e outro negativamente e um grupo de fármacos parcialmente ionizados, formado por fármacos ácidos, básicos e anfotéricos.

Os resultados evidenciam uma correlação linear satisfatória entre o octanol e os lipossomas para os compostos neutros ( $R^2 = 0,9324$ ) e parcialmente ionizados ( $R^2 = 0,9367$ ), contrariamente aos compostos carregados positiva ( $R^2 = 0,4672$ ) e negativamente ( $R^2 = 0,1487$ ). No caso dos fármacos neutros, devido à elevada fracção absorvida por via oral, obtiveram-se resultados similares nos dois modelos. No entanto, para os fármacos carregados, o modelo lipossomal apresenta uma correlação mais adequada com a absorção do que o que utiliza octanol. Estes resultados mostram que os compostos neutros interagem com as membranas, principalmente através de ligações hidrófobas, enquanto que fármacos carregados privilegiam interacções electrostáticas estabelecidas com os lipossomas. Conclui-se, então, que os lipossomas podem constituir um modelo biomembranar mais adequado do que o octanol para compostos carregados.

**Palavras-chave** – Coeficiente de Partição; Octanol; Lipossoma; Actividade Terapêutica; Absorção Oral

## Abstract

The absorption and consequent therapeutic action are key issues in the development of new drugs by the pharmaceutical industry. In this sense, different models can be used to simulate biological membranes in order to predict the absorption of a drug. This work compared the octanol/water and the liposome/water models. The following work is divided into two parts. In the first part, the two models are described and the main methods for determining the partition coefficient are presented. In the second part of the work, the correlation between the two models and the correlation between each model and absorption are displayed. The parameters used to relate the two models were the distribution coefficient ( $D$ ) to the liposomes ( $D_{L/W}$ ) and octanol ( $D_{O/W}$ ) and the fraction of drug orally absorbed ( $F_a$ ). For this study, sixty six drugs were collected from literature sources and divided into four groups according to the charge and the ionization degree. Thus, this work presents a group of neutral drugs, a positively charged group, a negatively charged group, and one group of partially ionized drugs formed by acid, basic and amphoteric drugs.

The results show a satisfactory linear correlation between the octanol and liposomes for the neutral ( $R^2 = 0,9324$ ) and partially ionized compounds ( $R^2 = 0,9367$ ), contrary to the positive ( $R^2 = 0,4672$ ) and negatively charged compounds ( $R^2 = 0,1487$ ). In the case of neutral drugs, the results were similar in both models, due to the high fraction orally absorbed. However, for the charged drugs, the liposomal model has a more appropriate correlation with the absorption than using octanol. These results show that the neutral compounds only interact with membranes through hydrophobic bonds, while charged drugs favor electrostatic interactions established with the liposomes. It is concluded that the liposomes may be a more appropriate biomembranes model than octanol for charged compounds.

**Keywords** – Partitioning Coefficient; Octanol; Liposome; Therapeutic Activity; Oral Absorption.

*Aos meus Pais, Irmão e Namorada pelo  
grande apoio que sempre me deram e pelo  
encorajamento ao longo deste curso.*

## **Agradecimentos**

O desenvolvimento e conclusão deste trabalho não seriam possível sem o apoio e colaboração de determinadas pessoas, a quem expresso o meu sincero agradecimento:

À Professora Doutora Carla Matos e à Professora Doutora Carla Moutinho pela competência com que orientaram este meu trabalho e o tempo que generosamente me dedicaram, transmitindo-me ensinamentos e sugestões úteis, com paciência, dedicação e simpatia;

Aos meus Pais, pelo amor, carinho e apoio incondicional, sem os quais esta etapa da minha vida não seria possível. Pela compreensão, coragem e pelos incentivos demonstrados ao longo desta caminhada e pelo sacrifício que fizeram... o meu eterno amor, admiração e profundo agradecimento;

Ao meu Irmão e Cunhada, pelo amor, apoio e incentivos recebidos ao longo de todos estes anos;

À minha Namorada, um grande obrigado por toda a paciência nas horas mais difíceis, por todo o amor, carinho e apoio dado que me ajudaram a ultrapassar as dificuldades... o meu amor e agradecimento.

Aos meus Amigos, Esmeralda e David, pela amizade e disponibilidade e pelas oportunas manifestações de companheirismo e de encorajamento;

À todos os Amigos que me acompanharam ao longo deste curso. Um obrigado pela sua amizade, companheirismo e boa disposição;

Agradeço ainda à Universidade Fernando Pessoa, a todos os meus professores pelos seus ensinamentos e àqueles que, directa ou indirectamente, contribuíram para a realização deste estudo.



## Índice

Resumo.....	V
Abstract.....	VI
Abreviaturas e símbolos.....	XIV
I. Introdução.....	1
II. Coeficiente de partição .....	2
III. Modelo Octanol/Água .....	4
3.1. Métodos de determinação do $P_{O/A}$ .....	5
3.1.1. Métodos directos .....	6
3.1.2. Métodos indirectos .....	10
3.2. Limitações do modelo octanol/água em relação ao uso de lipossomas .....	12
IV. Modelo Lipossoma/Água .....	14
4.1. Estrutura dos lipossomas.....	14
4.1.1. Núcleo hidrófobo dos lipossomas .....	17
4.1.2. Região polar dos lipossomas.....	18
4.1.3. Carga de superfície dos lipossomas .....	19
4.2. Interações fármaco/lipossoma .....	19
4.3. Preparação dos lipossomas .....	20
4.3.1. Formação do filme hidrolipídico.....	21
4.3.2. Hidratação do filme hidrolipídico .....	21
4.3.3. Sonicação .....	22
4.3.4. Extrusão .....	23
4.4. Métodos de determinação do $P_{L/A}$ .....	23
4.4.1. Métodos directos .....	24
4.4.2. Métodos indirectos .....	26
V. Correlação dos coeficientes de partição octanol/lipossoma e actividades farmacológicas.....	30

5.1. Correlação de compostos neutros .....	31
5.2. Correlação de compostos com carga negativa (ácidos) .....	33
5.3. Correlação de compostos com carga positiva (bases).....	35
5.4. Correlação de compostos parcialmente ionizados .....	38
VI. Discussão.....	41
VII. Conclusões .....	47
VIII. Bibliografia .....	49

## Índice de figuras

Figura 1 – Representação esquemática do método de agitação.....	6
Figura 2 – Representação esquemática do método de agitação lenta.....	8
Figura 3 – Representação esquemática do método de coluna .....	9
Figura 4 – Representação esquemática da extração F.I. ....	10
Figura 5 – Representação esquemática da partição por RP-HPLC .....	12
Figura 6 – Estrutura de um lipossoma.....	15
Figura 7 – Estrutura de um fosfolípido (fosfatidilcolina).....	15
Figura 8 – Tipos de lipossomas .....	17
Figura 9 – Representação esquemática das metodologias de preparação dos diferentes tipos de vesículas.....	20
Figura 10 – Representação esquemática do método de diálise .....	27

## Índice de tabelas

Tabela 1 – Exemplos de alguns agentes anfífilos comumente usados em modelos biomembranares.....	18
Tabela 2 – Lista de diversos fármacos neutros com respectivos valores de pKa, log $D_{L/A}$ , log $D_{O/A}$ e Fa (%).....	31
Tabela 3 – Lista de diversos fármacos negativos com respectivos valores de pKa, log $D_{L/A}$ , log $D_{O/A}$ e Fa (%) .....	33
Tabela 4 – Lista de diversos fármacos positivos com respectivos valores de pKa, log $D_{L/A}$ , log $D_{O/A}$ e Fa (%).....	36
Tabela 5 – Lista de diversos fármacos parcialmente ionizados com respectivos valores de pKa, log $D_{L/A}$ , log $D_{O/A}$ e Fa (%).....	39

## Índice de gráficos

Gráfico 1 – Correlação dos coeficientes de distribuição octanol vs lipossoma de fármacos neutros .....	32
Gráfico 2 – Correlação entre $\log D_{L/A}$ e Fa (%) (A) e entre $\log D_{O/A}$ e Fa (%) (B) de fármacos neutros .....	32
Gráfico 3 – Correlação dos coeficientes de distribuição octanol vs lipossoma de fármacos carregados negativamente (ácidos) .....	34
Gráfico 4 – Correlação entre $\log D_{L/A}$ e Fa (%) (A) e entre $\log D_{O/A}$ e Fa (%) (B) de fármacos carregados negativamente (ácidos) .....	35
Gráfico 5 – Correlação dos coeficientes de distribuição octanol vs lipossoma de fármacos carregados positivamente (bases).....	37
Gráfico 6 – Correlação entre $\log D_{L/A}$ e Fa (%) (A) e entre $\log D_{O/A}$ e Fa (%) (B) de fármacos carregados positivamente (bases).....	37
Gráfico 7 – Correlação dos coeficientes de distribuição octanol vs lipossoma de fármacos parcialmente ionizados.....	39
Gráfico 8 – Correlação entre $\log D_{L/A}$ e Fa (%) (A) e entre $\log D_{O/A}$ e Fa (%) (B) de fármacos parcialmente ionizados.....	40

## Abreviaturas e símbolos

- CACO-2 – Célula de adenocarcinoma de colo humano
- CCC – Cromatografia em contra corrente
- CPC – Cromatografia de partição centrífuga
- CTAC – Cloreto de cetiltrimetilamónio
- D – Coeficiente de distribuição
- DHP – Di-hexadecilfosfato de sódio
- $D_{L/A}$  – Coeficiente de distribuição lipossoma/água
- $D_{O/A}$  – Coeficiente de distribuição octanol/água
- DODAC – Cloreto de dioctadecildimetilamónio
- Fa – Fração de fármaco absorvido por via oral
- FI – Injecção de fluxo
- FIA – Análise por injecção de fluxo
- HDPC – Hexadecilfosfocolina
- HPLC – Cromatografia líquida de alta resolução
- HTAC – Cloreto de hexadeciltrimetilamónio
- IAM – Membrana artificial imobilizada
- ILC – Cromatografia de lipossomas imobilizados
- K – Coeficiente de partição
- $K_D$  – Coeficiente de distribuição
- $K_{O/A}$  – Coeficiente de partição octanol/água
- $K_P$  – Coeficiente de partição
- LCE – Electroforese capilar lipossomal
- LUV – Lipossomas unilamelares grandes
- MLV – Lipossomas multilamelares
- N - Neutros
- NMR – Ressonância magnética nuclear
- P – Coeficiente de partição
- PAMPA – Ensaio de permeabilidade em membranas artificiais paralelas
- PC – Fosfatidilcolina
- $pK_a$  – Constante de ionização
- $pK_a^{app}$  – Constante de ionização aparente
- $P_{L/A}$  – Coeficiente de partição lipossoma/água

- PM – Peso molecular
- $P_{O/A}$  – Coeficiente de partição octanol/água
- QSAR – Correlações quantitativas entre a estrutura e actividade biológica
- $R^2$  – Coeficiente de correlação
- RP-HPLC – Cromatografia líquida de alta resolução de fase reversa
- RP-TLC – Cromatografia em camada fina de fase reversa
- SDS – Dodecilsulfato de sódio
- SUV – Lipossomas unilamelares pequenos
- $T_c$  – Temperatura de transição de fase
- TLC – Cromatografia em camada fina
- UV-Vis – Ultravioleta-visível
- Z – Zwitteriónicos
- $\epsilon$  – Absortividade molar
- $\lambda$  – Comprimento de onda
- $\lambda_{\text{máx}}$  – Comprimento de onda correspondente à máxima absorção

## **I. Introdução**

O desenvolvimento de fármacos depara-se com uma questão importante, que é a capacidade de estes se relacionarem com as membranas celulares de forma a atingirem o seu local de acção e produzirem o efeito terapêutico desejado. Sendo assim, é necessário avaliar as propriedades físico-químicas dos fármacos de modo a obter um comportamento farmacocinético desejável sem, no entanto, perder a sua capacidade farmacodinâmica.

As membranas celulares, segundo o modelo de Singer e Nicholson, são flexíveis e têm como composição base uma bicamada lipídica constituída por fosfolípidos, na qual a região polar está orientada para a fase externa (aquosa) e a região apolar para a fase interna da bicamada. Nesta, estão inseridas proteínas, glicoproteínas, glicolípidos e colesterol, mantidos pelas interações hidrófobas entre os lípidos da membrana e as partes hidrófobas das proteínas. As proteínas podem encontrar-se, essencialmente, de duas formas distintas na membrana: as que atravessam a totalidade da bicamada lipídica, designadas por proteínas intrínsecas; as que se encontram aderentes a uma das faces da membrana, designadas por proteínas extrínsecas. As membranas celulares apresentam uma espessura de 3 nm (Nelson e Cox, 2002).

Para atravessar o centro lipídico das membranas, as moléculas devem ser hidrófobas e serem capazes de perder a sua esfera de hidratação. Muitos dos processos da distribuição dos fármacos dependem da sua habilidade em atravessar as membranas, daí haver uma grande correlação com as medidas de lipofilicidade. Além disso, muitas das proteínas envolvidas na distribuição dos fármacos possuem locais de ligação hidrófobos adicionais, aumentando a importância das medidas de lipofilicidade.

A lipofilicidade representa a afinidade que uma molécula possui para um ambiente lipídico. É frequentemente medida pelo comportamento de distribuição da molécula num sistema bifásico, sendo os sistemas de medição mais usados, o coeficiente de partição em octanol/água e em lipossoma/água (Smith *et alii.*, 2006), que serão descritos detalhadamente mais à frente.



## II. Coeficiente de partição

A porção hidrófoba da membrana pode ser modelada por um solvente orgânico, sendo o mais usado o octanol, proposto por Leo e colaboradores (1971), enquanto que o compartimento aquoso pode ser simulado por água ou um tampão aquoso. Sendo o solvente orgânico imiscível em água, está-se perante um sistema bifásico, que possui uma fase aquosa e outra orgânica. Assim, este sistema pode ser usado para determinar a partição do composto em estudo nas diferentes fases, aquosa (hidrófila) ou orgânica (hidrófoba ou lipófila).

Para um composto orgânico, a lipofilicidade pode ser descrita pelo seu coeficiente de partição,  $P$ , o que é determinado pela proporção das concentrações do composto em equilíbrio entre as duas fases:

$$P = \frac{[\text{Composto}]_{\text{orgânica}}}{[\text{Composto}]_{\text{aquosa}}}$$

O coeficiente de partição ( $\log P$ , como é geralmente expresso) descreve a lipofilicidade intrínseca dos grupos funcionais e do esqueleto de carbono, que se combinam para formar a estrutura do composto, na ausência de dissociação ou ionização. Cada componente de uma estrutura orgânica possui uma lipofilia definida e o seu coeficiente de partição pode ser determinado através da estrutura química (Smith *et alii.*, 2006). Assim, o efeito no valor de  $\log P$ , resultante da introdução de um grupo substituinte numa molécula, pode ser previsto pelo modelo matemático de correlação quantitativa entre a estrutura e actividade biológica (QSAR - quantitative structure-activity relationship) (Caron *et alii.*, 1999).

Quando o composto está parcialmente ionizado em fase aquosa, um novo equilíbrio é estabelecido, pois presume-se que, em condições normais, apenas as formas não ionizadas do fármaco penetram na fase orgânica. No entanto, a natureza dos substituintes em torno do átomo carregado bem como o grau de deslocamento da carga podem contribuir para a estabilização de espécies iónicas, não se excluindo deste modo, a sua partição numa fase orgânica ou membrana. Assim, coeficientes de partição de

moléculas ionizadas, ou que são medidas a um determinado pH, são conhecidos como coeficientes de distribuição  $D$  ( $\log D$ ), sendo este definido como a relação entre a concentração do composto na fase orgânica e a concentração do composto na forma ionizada e não ionizada na fase aquosa, a um determinado pH (Panchagnula e Thomas, 2000):

$$D = \frac{[\text{Composto}]_{\text{orgânica}}}{[\text{Composto ionizado}] + [\text{Composto não ionizado}]_{\text{aquosa}}}$$

Na literatura, o coeficiente de partição octanol/água é apresentado sob diversas designações: partição/distribuição, coeficiente/constante, proporção de distribuição, entre outros. Além do mais, vários símbolos, como  $K$ ,  $K_D$ ,  $K_P$ ,  $K_{O/A}$ ,  $P$  e  $D$ , têm sido usados para o representar (Danielsson e Zhang, 1996). Neste trabalho, foi escolhido o termo de coeficiente de partição, representado pelo símbolo  $P_{O/A}$  para o modelo octanol/água e  $P_{L/A}$  para o modelo lipossoma/água, e respectivo  $D_{O/A}$  e  $D_{L/A}$  no que diz respeito ao coeficiente de distribuição.

### **III. Modelo Octanol/Água**

Quando um fármaco, ou outra substância, é administrado no organismo, a sua passagem pelo compartimento lipídico é inevitável devido à natureza fosfolipídica das membranas, constituindo parte do trajecto entre o local de administração até ao compartimento plasmático e deste para o local de acção.

Gombar e Enslein (1996) afirmaram que o transporte transmembranar de uma molécula determina geralmente as suas propriedades biológicas como a absorção celular, a biodisponibilidade, a afinidade para o receptor, a ligação proteica, a actividade farmacológica ou a toxicidade. Desde os finais do século XVIII, as características de lipossolubilidade dos fármacos têm vindo a ser reconhecidas com elevada importância para a sua acção terapêutica. O conceito de distribuição de um soluto entre duas fases, nas quais é solúvel, tem sido relacionado desde há vários séculos com a sua lipossolubilidade, sendo usado em diversas aplicações (Leo *et alii.*, 1971).

A forma como as membranas celulares são atravessadas pelas moléculas tem sido objecto de numerosas investigações. Em 1899, Meyer e mais tarde Overton realizaram trabalhos segundo os quais os coeficientes de permeabilidade estão correlacionados com os coeficientes de partição óleo/água, surgindo assim a “Regra de Meyer-Overton” (*cit. in Carrozzino*, 2004).

No seguimento dos trabalhos de Overton, diversos trabalhos são posteriormente realizados com as mais variadas fases apolares, nos quais se encontram o azeite, clorofórmio, benzeno, ciclohexano, n-hexano, álcool oleico, heptano, hexadecano e os óleos minerais (Nasal *et alii.*, 2003; Saunders e Platts, 2004). O coeficiente de partição do fármaco num sistema de duas fases imiscíveis é posteriormente relacionado com parâmetros de "ligação hidrófoba", em sistemas biológicos e farmacológicos. O uso do coeficiente de partição alarga-se à sua relação com o balanço hidrófilo/lipófilo de moléculas, à determinação de equilíbrios de dissociação, a estudos com meios de troca iónica, a medidas de capacidade de estabelecer ligações hidrófobas, a estudos de estrutura/actividade e a medidas de dissolução e velocidade de partição de fármacos (Leo *et alii. cit. in Luo et alii.*, 2011). Esta área tem o seu grande avanço na década de 1960 com o trabalho de Hansch e Fujita (1964) e, desde então, tem sido intensamente utilizada.

Após os trabalhos realizados com variadas fases apolares, Leo e Hansch, recolhendo e analisando dados entretanto publicados, concluem que o uso do coeficiente de partição do sistema formado entre o octanol e a água é o indicador mais conveniente para o estudo das relações entre constantes de partição/actividade de substâncias (Leo e Hansch, 1971).

O coeficiente de partição octanol/água é uma medida da lipofilicidade de um composto e é definido como a razão da concentração do mesmo, no equilíbrio, após dissolução num sistema de duas fases, formadas por dois solventes imiscíveis, água e octanol (Silva e Ferreira, 2003). O parâmetro de partição é utilizado para modelar o comportamento das membranas biológicas e delinear o transporte, a distribuição e o destino dos fármacos no organismo (Klopman e Zhu, 2005; Kong *et alii.*, 2007). Possui, ainda, um papel fundamental na apresentação de QSAR (Leo *et alii.*, 1971; Sangster, 1989; Baena *et alii.*, 2004), tornando-se cruciais no desenvolvimento farmacêutico, encontrando um uso extensivo em relação ao parâmetro QSAR, no que diz respeito ao desenvolvimento de novos fármacos (Danielsson e Zhang, 1996). É também de grande importância na bioquímica, química medicinal e ambiental. Nos últimos anos, o  $P_{O/A}$  vem sendo utilizado em várias áreas, com um elevado número de publicações. Estas divulgam a sua correlação com outras propriedades físicas, químicas e biológicas dos compostos, além do sucesso do seu uso na determinação do coeficiente de partição, de factores de bioconcentração, de solubilidade e de toxicidade (Dearden, 1985; Ferreira, 2001; Silva e Ferreira, 2003).

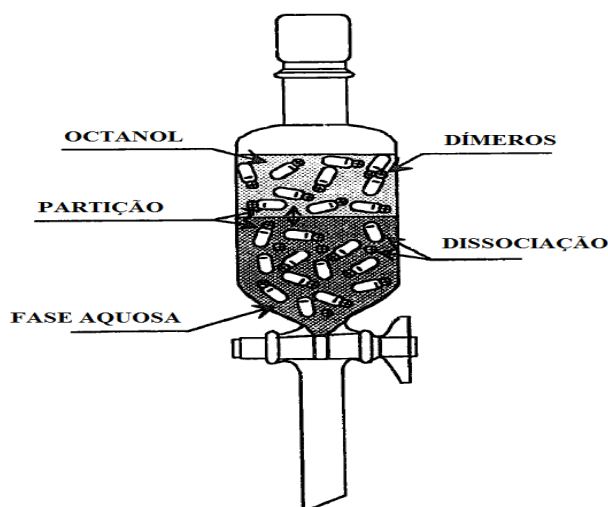
### **3.1. Métodos de determinação do $P_{O/A}$**

Danielsson e Zhang (1996) realizaram uma revisão dos métodos de medição do coeficiente de partição octanol/água, com especial ênfase sobre as suas aplicabilidades. Os métodos de determinação do  $P_{O/A}$  podem ser divididos em métodos directos e métodos indirectos. Nos métodos directos, a quantidade de soluto é determinada quantitativamente numa ou em ambas as fases de solvente, geralmente por medição da absorvância UV. Por outro lado, os métodos indirectos, em que não há análise quantitativa, são baseados na sua maioria em correlações dos factores de capacidade ou factores de retenção dos métodos cromatográficos com valores de  $P_{O/A}$  de referência determinados por método directo (Rogachev *et alii.*, 2003; Braekevelt *et alii.*, 2003).

### 3.1.1. Métodos directos

Nos métodos directos, a substância em estudo deve encontrar-se em equilíbrio entre as duas fases, nomeadamente octanol e água, ao longo do trabalho e das suas condições experimentais, e devem ainda ser respeitados parâmetros como o pH e a temperatura (Braekevelt *et alii.*, 2003). Se estes forem rigorosamente controlados, os métodos directos providenciam resultados exactos. Os métodos directos mais comuns são: método de agitação, método de agitação lenta, método de coluna e a titulação potenciométrica (Danielsson e Zhang, 1996).

O método de agitação é a técnica mais tradicional para determinar o  $P_{O/A}$ . Este método, divide-se em duas partes. Na primeira parte, a substância é introduzida juntamente com as duas fases (octanol e água) para uma ampola de decantação, sendo esta vigorosamente agitada por um longo período de tempo até se atingir o equilíbrio. Na segunda parte, segue-se um tempo de espera pela separação das fases (Figura 1) (Baka *et alii.*, 2008).



**Figura 1.** Representação esquemática do método de agitação. A seta bifurcada representa o interface onde a partição ocorre (Adaptado de Danielsson e Zhang, 1996).

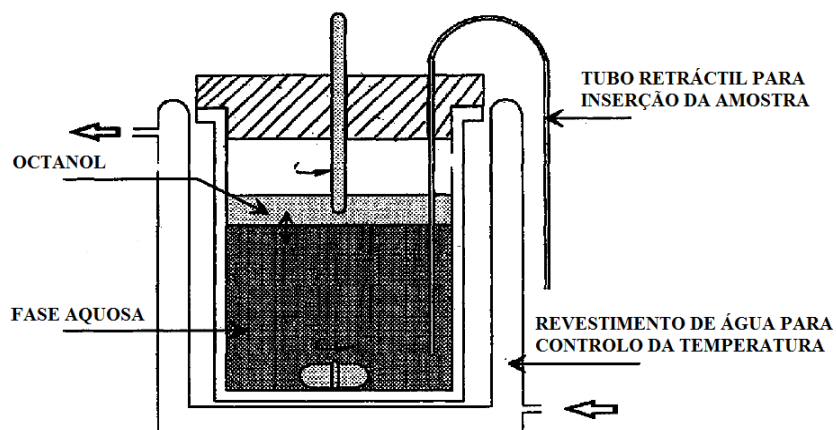
Após a separação das fases, a concentração da substância em estudo é quantificada. O intervalo de valores de coeficiente de partição, que podem ser determinados, está relacionado com a concentração mais baixa da substância teste, mensurável em cada fase (Danielsson e Zhang, 1996). Este método tem uma ampla

aplicação, embora limitado para valores de  $\log P_{O/A}$  situados entre -2 e 4 (Hong *et alii.*, 1997; OECD *cit. in* Kong *et alii.*, 2007). Inclui, também, uma série de considerações práticas a ter em atenção, designadamente (Poole e Poole, 2003; Kah e Brown, 2008):

1. a separação completa das fases, uma vez que qualquer gota de octanol na fase aquosa pode conter elevadas quantidades da amostra;
2. a pré-saturação das duas fases;
3. a concentração da amostra, que deve ser inferior à concentração micelar crítica;
4. as medições, que devem ser levadas a cabo a concentrações inferiores do limite da solubilidade aquosa;
5. os compostos lipófilos podem adsorver na superfície do material.

Sethi e colaboradores (2010) caracterizam este método como sendo penoso, demorado e inapropriado para compostos degradáveis, menos propício a automatização e os resultados podem ser falseados devido a impurezas.

O método de agitação foi desenvolvido e posteriormente transformado no método de agitação lenta por Brooke e colaboradores (1986). Neste método, a água é introduzida num recipiente juntamente com uma barra magnética recoberta por Teflon. Quando a fase aquosa alcança a temperatura desejada, a fase do octanol, contendo a substância em estudo, é introduzida cuidadosamente sobre a fase aquosa, para evitar a emulsão do meio e a consequente contaminação das fases. O meio é depois agitado através da barra magnética durante um determinado período de tempo (24h), permitindo alcançar o equilíbrio (Figura 2). As diferentes fases são seguidamente separadas, retirando-se amostras de ambas as fases para análise (Short *et alii.*, 2010).



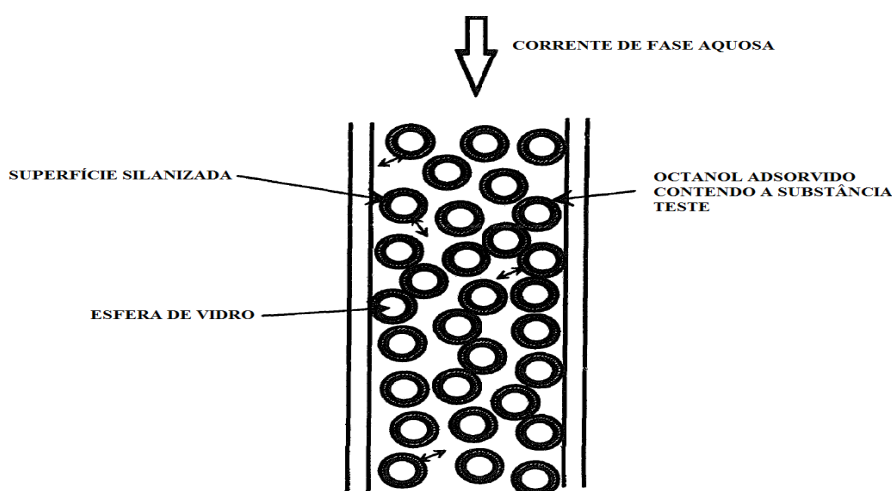
**Figura 2.** Representação esquemática do método de agitação lenta (adaptado de Danielsson e Zhang, 1996).

Os resultados obtidos por este método foram apresentados como sendo reprodutíveis e comparáveis a valores de  $P_{O/A}$ , obtidos por outras técnicas (Fisk *et alii.*, 1999). No entanto, para evitar a precipitação e a formação de micelas e emulsões causadas pelos ciclos de temperatura, é necessário o controlo deste parâmetro durante todo o procedimento. As dificuldades inerentes à absorção pelo vidro e a análise de substâncias com elevado ou baixo coeficiente de partição permanecem (Danielsson e Zhang, 1996).

A titulação potenciométrica também é considerada um método válido para a determinação do  $P_{O/A}$  de compostos ionizáveis. Esta técnica recorre à constante de ionização ( $pK_a$ ) da substância para determinar o  $P_{O/A}$ . Neste procedimento, é estimado o valor de  $pK_a$  através de duas titulações da substância em estudo, com e sem octanol. O coeficiente de partição é calculado de acordo com a diferença do valor de  $pK_a$  na ausência e presença do octanol. Este método é útil e rápido, mas requer solutos consideravelmente ácidos ou básicos (Degim *et alii.*, 2001). É aplicável de forma satisfatória para compostos ionizáveis monopróticos ou dipróticos com valores de  $pK_a$  entre 3 e 10, sendo estes mais fáceis de analisar que compostos com valores de  $pK_a$  extremos (Barzanti *et alii.*, 2007).

O método de coluna é igualmente referenciado na literatura (Danielson e Zhang, 1996) para determinar as constantes de partição de compostos no sistema octanol/água, principalmente para valores elevados. Este método consiste numa fase estacionária

montada numa coluna preenchida com um suporte sólido inerte, geralmente esferas de vidro (Ghosh *et alii.*, 1998) ou Chromosorb W-HP (Dohányosová *et alii.*, 2003), revestido com o solvente orgânico (octanol), saturado de água e contendo uma concentração conhecida da substância em estudo. Uma fase aquosa móvel, saturada de octanol, é injectada e recolhida no fim da coluna (Figura 3) (Ghosh *et alii.*, 1998). O valor de  $P_{O/A}$  pode ser determinado, usando a concentração da substância que sai da coluna juntamente com a da fase aquosa e a concentração inicial na fase do octanol, através de diferentes métodos de análise, como a espectrofotometria UV (Dohányosová *et alii.*, 2003) ou cromatografia gasosa (Ghosh *et alii.*, 1998).



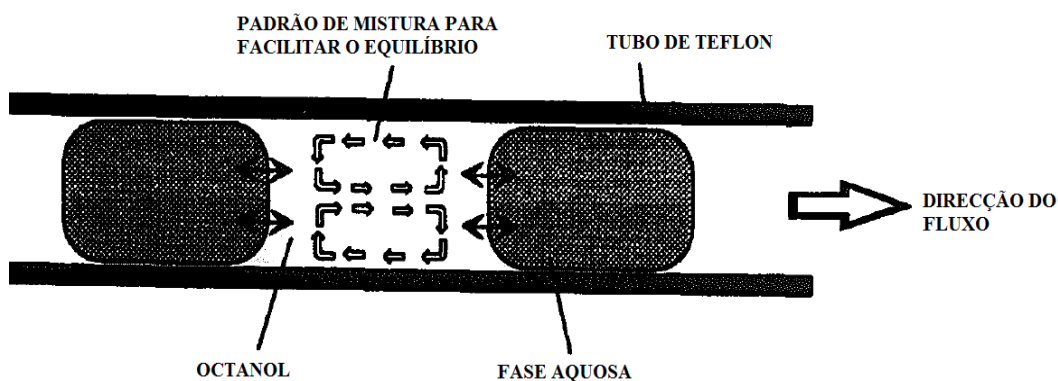
**Figura 3.** Representação esquemática do método de coluna (adaptado de Danielsson e Zhang, 1996).

Diversas vantagens deste método são apresentadas, nomeadamente a redução de formação de emulsão e o aumento do interface octanol/água, permitindo obter um rápido equilíbrio. Devido ao uso de um sistema de corrente contínuo e fechado, os erros, ocorridos pela perda de compostos voláteis, são minimizados. No entanto, não está claro se o valor de  $P_{O/A}$ , obtido por este método, representa verdadeiramente o equilíbrio termodinâmico do composto entre o octanol e a água (Danielsson e Zhang, 1996).

A extracção por injeção de fluxo (FI) refere-se a um sistema de extracção contínuo, baseado numa análise de injeção de fluxo (FIA – flow injection analysis) e num fluxo segmentado líquido-líquido. Na década de noventa, foram feitos esforços para estabelecer um procedimento directo e rápido para a determinação do  $P_{O/A}$  no



sistema octanol/água, baseado no sistema de extracção por injeção de fluxo (Danielsson e Zhang, 1996). Dois fluxos, um de octanol e outro de fase aquosa, contendo a substância em estudo dissolvida, são misturados num tubo estreito. As duas fases imiscíveis são continuamente bombeadas no sistema e segmentadas uma com a outra de forma controlada (Figura 4). A substância distribuída entre as duas fases seccionadas segue para o ponto de extracção (Carlsson e Karlberg, 2000).



**Figura 4.** Representação esquemática da extração F.I. (adaptado de Danielsson e Zhang, 1996).

Após o equilíbrio ser atingido, a fracção aquosa é separada e dirigida para um espectrofotómetro. Este método é simples e facilmente reproduzível, consome menos tempo e necessita de pequenas quantidades de amostra (Carlsson e Karlberg, 2000).

### 3.1.2. Métodos indirectos

A maioria dos métodos indirectos baseia-se em correlações dos factores de capacidade da cromatografia com o seu valor de  $P_{O/A}$  conhecido. Rogachev e colaboradores (2003) afirmam que os métodos indirectos demonstram certas vantagens para efeitos de rastreio, em que métodos simples e rápidos são necessários. Os métodos mais comuns são: a cromatografia em contra corrente (CCC), a cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) e a cromatografia em camada fina (TLC) (Rogachev *et alii.*, 2003).

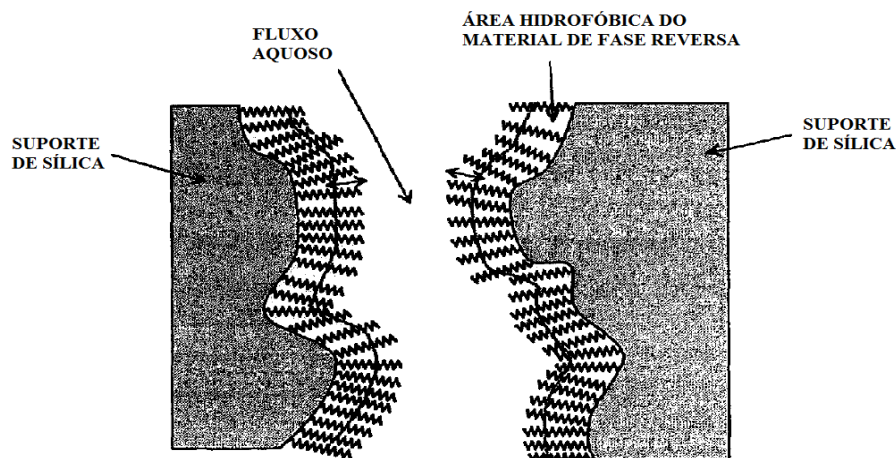
Na cromatografia de contra corrente (CCC), dois solventes imiscíveis (octanol e água) em equilíbrio são usados. O instrumento retém um dos solventes, funcionando como fase estacionária, e um outro é bombeado como fase móvel. Sucede-se, assim, o

processo cromatográfico, onde ocorre a partição do soluto entre as duas fases. Para segurar a fase estacionária, é utilizado um campo gravitacional variável ou centrifugal em vez de um suporte sólido inerte convencional. Quando a CCC usa uma força centrífuga, é denominada cromatografia de partição centrífuga (CPC – centrifugal partition chromatography). Nesta técnica, o  $P_{O/A}$  é determinado pelo volume de retenção do soluto e pelo volume da fase estacionária e da fase móvel do sistema usado (Foucault, 2001). Por não usar uma matriz de suporte sólida, a CCC/CPC apresenta uma elevada precisão, que rivaliza com a obtida pelo método da agitação, e não apresenta complicações, como uma excessiva adsorção e/ou degradação das amostras, contaminação e limitações de pH. Permite, ainda, o uso duma amostra de tamanho reduzido, sendo insensível a impurezas e de fácil mecanização. Infelizmente, esta técnica é limitada para valores de  $P_{O/A}$  superiores a 4,3, apresentando elevado tempo de análise e desgaste do material (Danielsson e Zhang, 1996).

Danielsson e Zhang (1996) descrevem outro método indirecto, usado para a obtenção da lipofilia de compostos, a HPLC, que com a fase estacionária e a fase móvel adequadas, obtêm resultados que reflectem a lipofilia do soluto, sendo um procedimento de fácil execução, preciso e fidedigno, tornando-se útil na obtenção de resultados com uma precisão até agora não atingida. Este método pode ser usado para medir valores de  $P_{O/A}$  situados entre 1 e 6 (USEPA *cit. in* Kong *et alii.*, 2007).

As técnicas de cromatografia de fase reversa, em particular a cromatografia líquida de alta resolução (RP-HPLC) (Figura 5) e a cromatografia em camada fina (RP-TLC), simulam a partição entre o octanol e a água, sendo consideradas alternativas populares para a avaliação da lipofilia (Giaginis e Tsantili-Kakoulidou, 2008). Os valores de lipofilia, medidos por RP-HPLC variam entre 0 e 6 (Paschke *et alii.*, 2001) e por RP-TLC entre 0 e 12, sendo obtidos pelo tempo de retenção e pela distância de migração relativamente ao solvente, fornecendo resultados precisos (Danielsson e Zhang, 1996). As principais vantagens destes procedimentos são: *i)* a rapidez; *ii)* a reprodutibilidade; *iii)* a não degradação dos produtos; *iv)* a não susceptibilidade às impurezas; *v)* o largo intervalo de trabalho; *vi)* a utilização de amostras de tamanho reduzidas (Paschke *et alii.*, 2001). O facto do coeficiente de partição ser obtido pela calibração do factor de capacidade contra valores de  $P_{O/A}$  já existentes de compostos estruturalmente similares explica porque a RP-HPLC funciona melhor para determinar

valores de partição de estruturas homólogas, podendo ser alvo de falhas quando usado em compostos sem relação estrutural.



**Figura 5.** Representação esquemática da partição por RP-HPLC (adaptado de Danielsson e Zhang, 1996).

A RP-HPLC também é menos adequada para compostos na forma iônica, uma vez que o intervalo de pH, sob o qual o material empacotado é estável, limita o intervalo de  $P_{O/A}$ , o qual pode ser determinado sob condições isocráticas. Modificações no eluente da fase móvel podem resolver o problema, mas resulta numa perda de precisão (Danielsson e Zhang, 1996).

### 3.2. Limitações do sistema octanol/água em relação ao uso de lipossomas

O sistema octanol/água é o modelo de membrana biológica mais usado. No entanto, pouco depois dos primeiros estudos, surgiram críticas a este sistema por possuir apenas similaridade com a superfície das biomembranas e por não simular o comportamento da bicamada fosfolipídica das membranas biológicas (Vrakas *et alii.*, 2008). Os solventes orgânicos, como o octanol, formam uma fase compacta e isotrópica quanto às suas propriedades físico-químicas, observando-se uma continuidade ao longo de toda a fase. Contrariamente, a bicamada lipídica é considerada uma fase interfacial de matéria na qual as propriedades físicas variam com a distância à superfície. O octanol interage com os solutos através de interações hidrófobas e pontes de hidrogénio, mas falha em mimetizar o comportamento interfacial característico da

bicamada membranar e as interacções iónicas entre os fosfolípidos da membrana e os solutos (Balon *et alii.*, 1999). Deste modo, os coeficientes de partição determinados reflectem apenas as interacções hidrófobas.

Tradicionalmente, pensava-se que apenas as moléculas neutras eram capazes de atravessar as membranas (Shore *et alii.*, 1957). Assim sendo, foi dada atenção para os coeficientes de partição das formas neutras de compostos ionizáveis. Correlações satisfatórias de valores de coeficiente de partição de partículas neutras foram determinadas entre o sistema octanol/água e o lipossoma/água (Wang *et alii.*, 2007). O mesmo não ocorre para solutos ionizados, uma vez que a partição de espécies ionizadas melhora significativamente em bicamadas lipídicas anisotrópicas relativamente ao octanol, presumivelmente devido à formação de ligações iónicas com os grupos fosfatos carregados negativamente (Fruttero *et alii.*, 1998). No entanto, inúmeros fármacos bem absorvidos aparecem sob a forma de iões no intestino delgado. O coeficiente de partição relativamente baixo em octanol para as espécies iónicas não explica a absorção desses fármacos. Estudos com vesículas de membranas lipídicas, levados a cabo por Alcorn e colaboradores (1993), e com colunas de membranas artificiais imobilizadas, realizados por Barbato e colaboradores (1997), revelaram importantes diferenças nas interacções dos fármacos entre fosfolípidos e octanol, principalmente para formas ionizadas. Claramente, o sistema octanol/água é insuficiente para contabilizar certas características críticas das membranas biológicas, as quais possuem grupos anfipáticos capazes de estabelecerem interacções electrostáticas fortes. Estas diferenças podem ser compreendidas à luz da informação estrutural e de modelos moleculares dos fármacos na bicamada, isto porque, em octanol, o fármaco encontra-se disperso aleatoriamente pelo solvente, enquanto que, numa bicamada ocupa uma posição definida, consoante as interacções hidrófobas ou iónicas que estabelece (Sethi *et alii.*, 2010).

Neste contexto, o sistema de partição lipossoma/água oferece uma alternativa atraente de interesse considerável uma vez que é considerado um modelo directo das membranas biológicas (Marcelino *et alii.*, 2007). Assim sendo, modelos de partição, incluindo fosfolípidos como fase lipídica, descrevem a partição na membrana de fármacos ionizados de forma mais apropriada (Ikonen *et alii.*, 2007).

#### **IV. Modelo Lipossoma/Água**

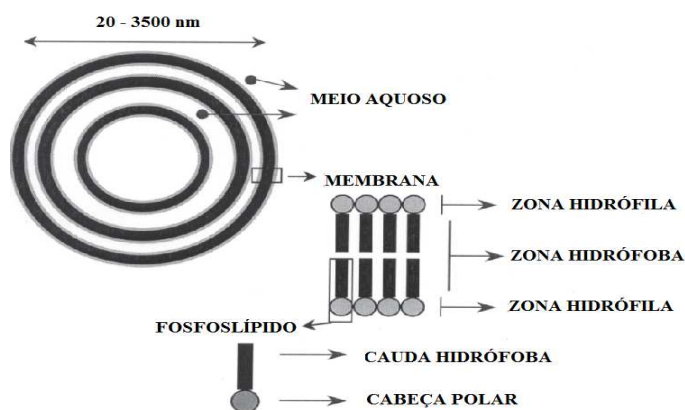
Tal como referido anteriormente, os estudos de lipofilicidade e de partição dos compostos farmacêuticos, de forma a prever o seu comportamento no organismo, são obtidos através do sistema octanol/água (Rogers e Choi, 1993).

Devido a sua semelhança com as membranas lipídicas biológicas, sistemas como micelas e lipossomas despertaram a atenção dos investigadores no sentido da pesquisa e desenvolvimento destas estruturas como modelos biomembranares. Enquanto as micelas são agregados simples de lípidos, contendo um núcleo hidrófobo e uma parte externa hidrófila, os lipossomas apresentam a bicamada lipídica e a anisotropia verificada nas membranas celulares (Lasic, 1998). Os lipossomas são de fácil obtenção e manuseamento, como será descrito posteriormente, daí serem preferidos às células ou aos tecidos animais.

Segundo vários autores, o sistema lipossoma/água constitui o melhor modelo, uma vez que possui um arranjo molecular ordenado, características estruturais que variam de um estado cristal-líquido para um estado de gel rígido e exerce influências electrostáticas, em contraste com o sistema octanol/água (Katz e Diamond, 1974; De Young e Dill, 1988). Os lipossomas têm mostrado melhores correlações de transporte de fármacos através da membrana, comportamento farmacocinético e actividade biológica de algumas classes de fármacos em relação ao sistema octanol/água (Choi e Rogers, 1990).

##### **4.1. Estrutura dos lipossomas**

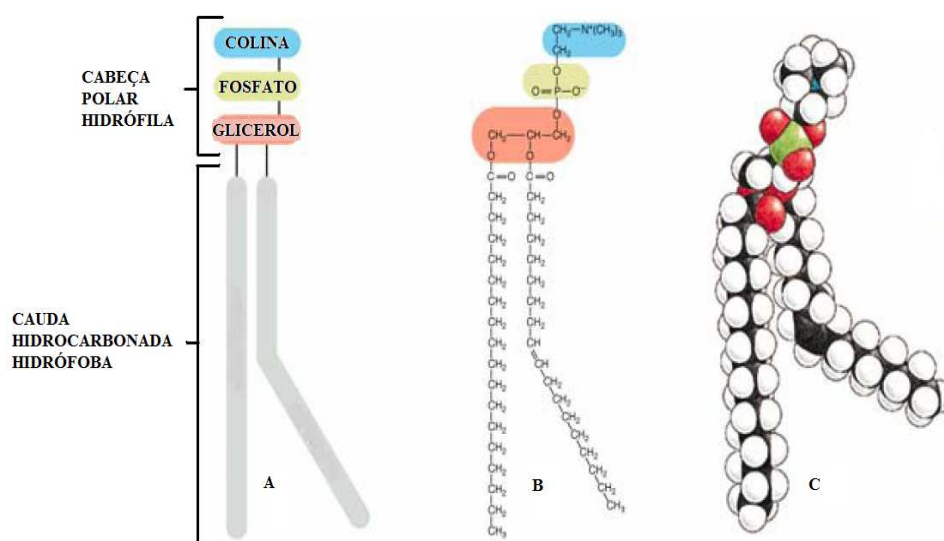
Os lipossomas começaram por ser investigados no início dos anos 60. São sistemas esféricos fechados, compostos por uma bicamada lipídica que aprisiona no seu interior parte do veículo em que livremente se encontram (Figura 6). São predominantemente compostos por moléculas anfifílicas, tais como fosfolípidos (Frézard *et alii.*, 2005). Devido ao seu carácter anfifílico, os fosfolípidos têm uma tendência forte, tanto na ausência (raramente) como na presença de água, para agregar espontaneamente de forma ordenada, geralmente lamelar, em estruturas em bicamada como membranas ou lipossomas (Lasic, 1988).



**Figura 6.** Estrutura do lipossoma (adaptado de Frézard *et alii.*, 2005)

Os lipossomas podem ser preparados a partir de uma variedade de agentes anfífilicos (Tabela 1) e das suas misturas, mas nem todos são capazes de formar lipossomas estáveis (Domińska e Blanchard, 2009). Segundo Sułkowski e colaboradores (2005), os lípidos mais usados na obtenção de sistemas padronizados e facilmente reprodutíveis são os fosfolípidos, particularmente as fosfatidilcolinas (PCs) (Figura 7).

As PCs possuem uma molécula de colina ligada ao grupo fosfato da cabeça polar e duas longas cadeias de hidrocarbonetos, que constituem a sua cauda hidrófoba. Diferem acentuadamente de outras moléculas anfipáticas (por exemplo, detergentes), formando bicamadas esféricas, em vez de micelas, provavelmente devido à sua forma tubular resultante das duas cadeias de ácidos gordos.



**Figura 7.** Estrutura de um fosfolípido (fosfatidilcolina): A) representação esquemática; B) fórmula estrutural; C) arranjo espacial (adaptado de Torres, 2008)

Pelo contrário, os detergentes com uma cabeça polar e uma cadeia única assumem uma forma cónica, que se encaixa perfeitamente numa micela de estrutura esférica. Os fosfolípidos, em presença dum meio aquoso, formam uma estrutura com uma bicamada membrana, com a parte hidrófila (cabeça polar) em contacto com a fase aquosa, e a parte hidrófoba (cauda apolar ou cadeias hidrófobas), orientada para o interior da bicamada (Milhaud, 2004). Os lipossomas adoptam uma forma esférica e são compostos de uma a várias centenas de bicamadas concêntricas. O seu tamanho varia de 20 nm até várias dezenas de micrómetros, enquanto que a espessura da membrana é de aproximadamente 4 a 7 nm.

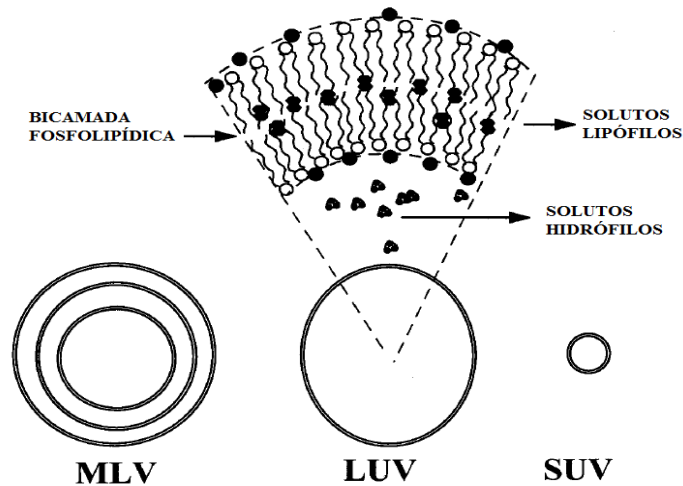
Os lipossomas podem ser classificados segundo o método de preparação, o número de bicamadas que possuem ou o seu tamanho. Frézard e colaboradores (2005), referem que a classificação dos lipossomas, através do número de bicamadas e tamanho, é a mais comum (Figura 8).

Uma definição mais detalhada entre vesículas grandes e pequenas classifica os lipossomas como (Sharma e Sharma, 1997):

- Lipossomas multilamelares (Multilamellar Vesicles - MLV): são aqueles formados por várias bicamadas concêntricas, intercaladas por compartimentos aquosos. Possuem um diâmetro variável dependendo do número de lamelas, podendo variar de 400 a 3500 nm.

- Lipossomas unilamelares grandes (Large Unilamellar Vesicles - LUV): são aqueles formados por uma única bicamada concêntrica, com um único compartimento aquoso. Possuem um diâmetro entre 200 a 1000 nm.

- Lipossomas unilamelares pequenos (Small unilamellar Vesicles - SUV): são os mais pequenos que se podem obter. Também são constituídos por uma única bicamada e um único compartimento aquoso. São termodinamicamente instáveis, susceptíveis de agregação e fusão. O seu diâmetro varia entre 20 a 50 nm.



**Figura 8.** Tipos de lipossomas (adaptado de Sharma e Sharma, 1997)

A utilização de lipossomas como sistemas biomiméticos naturais implica, muitas vezes, o uso de vesículas com propriedades bem definidas com vista à compreensão do impacto de cada factor na membrana. Assim, os LUVs são apresentados com maior interesse prático, uma vez que apresentam uma única membrana e um volume de solução aquosa razoavelmente grande no seu interior (Mansilha, 2002).

#### 4.1.1. Núcleo hidrófobo dos lipossomas

Nas membranas, os fosfolípidos estão alinhados perpendicularmente com o glicerol no plano membranar e as cabeças polares das PCs estão dispostas praticamente de forma paralela à superfície da membrana. Esta conformação reduz a distância entre a carga positiva da colina e negativa do fosfato na molécula de fosfolípido. No entanto, numa conformação estendida da molécula, a cabeça polar é mais volumosa do que as duas cadeias de ácidos gordos (van Balen *et alii.*, 2004). De forma a superar esse obstáculo, as cadeias de ácidos gordos estão inclinadas num ângulo de 30° em relação ao plano membranar. Esta orientação foi demonstrada através de estudos de difracção de neutrões (Seelig *et alii.*, 1987). As PCs podem vincular entre 10 a 12 moléculas de água por molécula de lípido, através de ligações de hidrogénio no grupo fosfato (Hauser *et alii.*, 1981). Numa molécula de PC, a parte mais rígida é a que contém o glicerol. O grupo acil metileno mais próximo aos grupos carbonilo confere um elevado grau de rigidez, que vai diminuindo progressivamente a partir do carbono número 9 (van Balen *et alii.*, 2004).

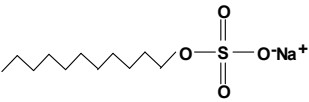

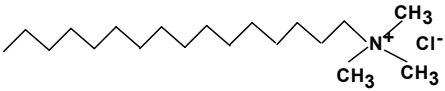



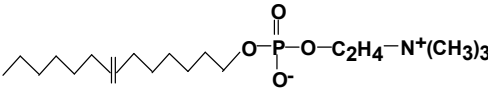
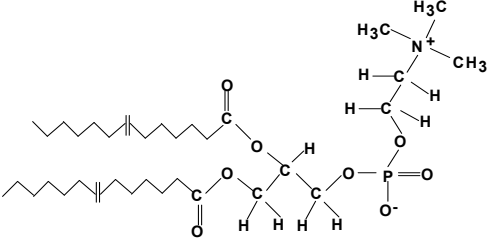
#### 4.1.2. Região polar dos lipossomas

Os grupos polares dos lípidos são de particular importância para as propriedades eléctricas da superfície da membrana. Para estudar as interações entre solutos e uma membrana, como um lipossoma, é importante entender a dinâmica e as interações entre os grupos nas regiões polares da membrana (van Balen *et alii.*, 2004).

Segundo Ferreira e colaboradores (2005), as cabeças polares das moléculas anfífilicas são em grande parte responsáveis pelas suas propriedades físico-químicas. Os agentes anfífilicos são classificados usualmente em aniónicos, catiónicos, zwitteriónicos e não iónicos (Tabela 1) (Attwood e Florence, 1983; Jones e Chapman 1995; Pramauro e Pelezetti, 1996).

**Tabela 1.** Exemplos de alguns agentes anfífilicos comumente usados em modelos biomembranares.

Agente Anfílico		Estrutura Química
<b>I - Aniónicos</b>	Dodecilsulfato de sódio (SDS)	
	Di-hexadecilfosfato de sódio (DHP)	
<b>II - Catiónicos</b>	Cloreto de hexadeciltrimetilamónio (HTAC) ou Cloreto de cetiltrimetilamónio (CTAC)	
	Cloreto de dioctadecildimetilamónio (DODAC)	

<b>III - Não-iônicos</b>	Polioxi-etileno (9,5)- <i>t</i> -octilfenol (Triton X100)	$(\text{CH}_3)_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{9,5}\text{H}$
<b>IV - Zwitteriônicos</b>	Hexadecilfosfocolina (HDPC)	
	Fosfatidilcolina ou Lecitina (PC)	

#### 4.1.3. Carga de superfície

Outra característica importante para determinar as interações electrostáticas entre o soluto e uma membrana é a carga de superfície das membranas. A carga de superfície de uma membrana lipídica pode variar com o pH e/ou com a ligação de iões ou de solutos carregados à membrana. Esta depende também dos lípidos presentes na superfície da bicamada e pode ser quantificada por medições de potencial zeta (van Balen *et alii.*, 2004). Como as PCs dos lipossomas possuem o grupo fosfato carregado negativamente e o grupo colina carregado positivamente, estas têm uma carga igual a zero e, num intervalo de pH entre 2 e 11, o seu potencial zeta é neutro. Para valores de pH superiores a 11, aumenta a hidrólise das PCs, tornando o potencial zeta negativo e, para valores de pH inferiores a 2, o potencial zeta é positivo devido a protonação do grupo fosfato, com um valor de  $\text{pK}_a$  igual a 1,97, anulando as cargas negativas (Krämer e Wunderli-Allenspach, 1996; Krämer *et alii.*, 1997)

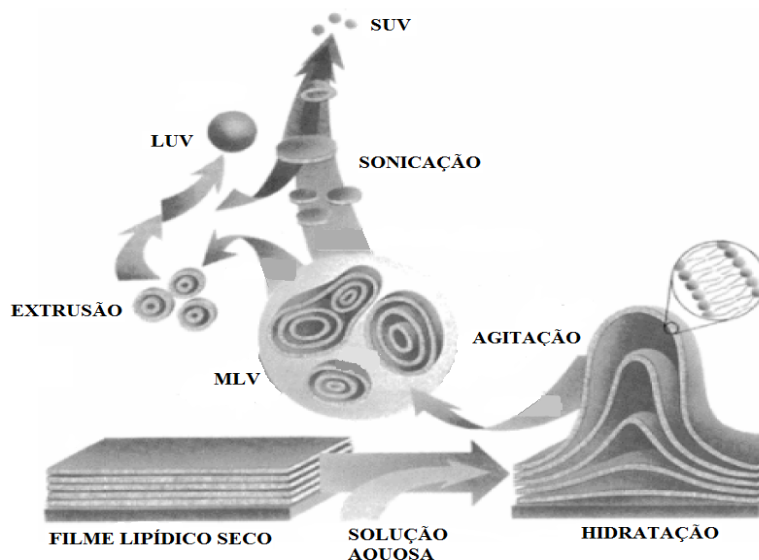
#### 4.2. Interações fármaco/lipossoma

Os fármacos podem interagir com os lipossomas, através das suas membranas, de quatro formas distintas (Lasic, 1996). Podem ligar-se aos grupos polares da membrana, nomeadamente ao grupo fosfato carregado negativamente e ao grupo colina carregado positivamente, estabelecendo ligações electrostáticas ou iónicas; dissolvidos na bicamada lipídica estabelecendo ligações hidrófobas ou de Van der Waals; podem

ainda encontrarem-se intercalados na membrana, divididos entre a parte hidrófoba e hidrófila do lipossoma; e ainda aprisionados na fase interna aquosa do lipossoma.

### **4.3. Preparação dos lipossomas**

Lasic (1988) sugere alguns mecanismos para a formação de lipossomas. Estes são formados quando filmes lipídicos no estado cristalino dispostos em pilhas são hidratados, ocorrendo a permeação da fase aquosa através das bicamadas, sendo a hidratação maior nas camadas externas do que nas camadas internas. As folhas de lípidos hidratadas separam-se durante a agitação e fecham-se sobre elas mesmas para formar MLVs, devendo-se a área superficial das cabeças polares crescer com o aumento da hidratação e, impedindo assim, a interação da água com o núcleo de hidrocarbonetos hidrófobos. A formação das vesículas é interrompida, quando é atingida uma distância de equilíbrios entre as duas camadas. Após a formação das partículas, reduzir o seu tamanho requer entrada de energia na forma de energia sonora (sonicação) ou energia mecânica (extrusão) (Figura 9).



**Figura 9.** Representação esquemática das metodologias de preparação dos diferentes tipos de vesículas (adaptado de Mansilha, 2002).

Além destes métodos, os lipossomas também podem ser preparados por outros métodos, designadamente a microfluidização, a liofilização-reidratação, a congelação-descongelação, a injeção de etanol ou de clorofórmio, a evaporação de fase reversa, a infusão de éter e remoção de detergente, entre outros (Torres, 2008).

Segundo Ferreira e colaboradores (2005), a preparação de lipossomas a partir de lipossomas contendo PCs, sendo estas moléculas zwitteriónicas a pH fisiológico, possuem a vantagem de se poder manusear à temperatura ambiente sendo relativamente inertes quimicamente e passíveis de serem obtidas a baixo custo. Exigem, no entanto, alguns cuidados na preparação de vesículas, como a preparação na ausência de luz e oxigénio, uma vez que os fosfolípidos são sensíveis à temperatura, ao oxigénio, a luz e aos agentes oxidantes.

#### **4.3.1. Formação do filme lipídico**

Quando se preparam lipossomas com uma mistura de lípidos (PCs, colesterol, entre outros), estes devem estar inicialmente dissolvidos e misturados num solvente orgânico para assegurar a homogeneidade da mistura lipídica. Usualmente, este processo é levado a cabo usando clorofórmio, de forma a obter uma solução pura de lípidos ou uma mistura completa de lípidos (Demana *et alii.*, 2004). Por norma, as soluções lipídicas são preparadas com uma concentração até 20 mg de lípido/ml de solvente orgânico.

Seguidamente, o solvente orgânico é removido para dar origem a um filme lipídico. Este é eliminado por evaporação rotativa, usando uma bomba de vácuo, deixando um fino filme lipídico nas paredes de um balão de fundo redondo (Copland *et alii.*, 2000), ou, usando um fluxo de azoto seco num exaustor (An *et alii.*, 2009).

#### **4.3.2. Hidratação do filme lipídico**

O processo de hidratação lipídica com objectivo de obter vesículas com múltiplas bicamadas foi primeiramente descrito por Bangham (1965). A hidratação do filme lipídico ocorre por adição de uma solução aquosa e respectiva agitação. Além da água destilada, a fase aquosa é geralmente composta por soluções tampão, soluções salinas e electrólitos.

A adição da fase aquosa deve ser feita tendo em atenção a temperatura. Os lípidos possuem uma temperatura de transição de fase ( $T_c$ ) característica, existindo assim em diferentes estados físicos acima e abaixo da  $T_c$ . A temperaturas inferiores a  $T_c$ , os lípidos estão ordenadamente arranjados num estado sólido (fase de gel sólido). Para valores superiores a  $T_c$ , os lípidos encontram-se num estado fluido (fase cristal-líquido). A fluidez da membrana dos lipossomas pode ser alterada por diferentes fosfolípidos com diferentes  $T_c$ , podendo variar dos -20 até aos 90 °C dependendo do tamanho e natureza (saturada ou insaturada) da cadeia de ácido gordo. As membranas, que contêm lípidos com elevado  $T_c$  ( $T_c > 37$  °C), são menos fluidas e permeáveis à temperatura fisiológica. Por outro lado, lipossomas compostos por lípidos com baixo  $T_c$  ( $T_c < 37$  °C) possuem membranas mais fluidas e permeáveis à temperatura fisiológica (Sharma e Sharma, 1997). A temperatura do fluido hidratante deve encontrar-se acima da temperatura de transição do estado cristalino para o estado gel-líquido do lípido com a  $T_c$  mais alta antes da sua adição ao filme lipídico seco. Após a adição da solução hidratante, a suspensão de lípidos resultante deve permanecer acima da  $T_c$  durante todo o tempo da hidratação de forma a assegurar a formação de lipossomas (Barriocanal *et alii.*, 2004). A manutenção da temperatura acima da  $T_c$  é feita muitas vezes através de um evaporador rotativo sem sistema de vácuo, em que o sistema é aquecido pelo banho de água e com devida agitação.

#### **4.3.3. Sonicação**

O processo de sonicação consiste no rompimento da suspensão de MLVs, que utiliza energia sónica, produzindo assim SUVs. A instrumentação mais comum é composta por banhos e sondas de sonicação (Pereira-Lachataignerais *et alii.*, 2006).

Segundo Pereira-Lachataignerais e colaboradores (2006), as sondas fornecem uma elevada quantidade de energia à suspensão lipídica, sofrendo, desta forma, um sobreaquecimento que leva à sua degradação, sendo necessário controlar a temperatura. A sonicação é levada a cabo em sessões de 50 minutos, não ultrapassando os 10 minutos sucessivos. Estas sondas têm tendência em libertar partículas de titânio que devem ser removidas por centrifugação (Chorilli *et alii.*, 2007). Ao longo da sonicação, a suspensão começa a clarificar, permanecendo sempre uma ligeira turvação devido à presença de vesículas maiores residuais, podendo ser removidas por centrifugação (Kim *et alii.*, 2007). O tamanho médio e a distribuição das SUVs, são influenciados pela

composição, temperatura, tempo e potência de sonicação (Pereira-Lachataignerais *et alii.*, 2006).

#### **4.3.4. Extrusão**

A extrusão lipídica é uma técnica em que a suspensão lipídica é forçada a passar por um filtro de policarbonato com poros de um determinado tamanho, definido para produzir partículas com um diâmetro perto do tamanho dos poros do filtro utilizado.

Antes da extrusão através do poro final definido, a suspensão de MLVs é dividida por vários ciclos de congelamento e descongelamento, geralmente três, seguida por uma filtração que usa filtros sucessivos com um tamanho de poro decrescente (Berger *et alii.*, 2001). Este pré-tratamento da suspensão previne que a membrana sofra deposição e melhora a homogeneidade da distribuição de tamanho na suspensão final.

Comparado com métodos convencionais, este procedimento torna possível a preparação de lipossomas com um tamanho específico pela variação do diâmetro dos poros na membrana usada, resultando suspensões de lipossomas homogêneos (An *et alii.*, 2009).

#### **4.4. Métodos de determinação do $P_{L/A}$**

Existem dois tipos de métodos para a determinação do coeficiente de partição lipossoma/água, os métodos directos e os métodos indirectos. Nos métodos directos, não há nenhum mecanismo de retenção ou separação de fases envolvido, sendo o  $P_{L/A}$  determinado directamente nas soluções, nas quais o soluto no agregado se encontra em equilíbrio com o soluto livre em solução. O valor do  $P_{L/A}$  é determinado por avaliação da alteração de uma propriedade de um dos componentes do sistema (Melo, 2007):

- 1) propriedades do soluto que se alteram após interacção com o lipossoma, tais como, as suas propriedades espectroscópicas ou características ácido/base;
- 2) propriedades do lipossoma que se alteram por acção do soluto, como a permeabilidade, fluidez, tensão superficial, temperatura de transição de fase, carga superficial, entre outras;

- 3) propriedade de uma terceira molécula que pode ser incorporada no sistema e funcionar como sonda, por exemplo, sondas de fluorescência, e cuja variação das propriedades em função da interacção molecular é usada para avaliar a extensão da interacção.

Os métodos indirectos recorrem a uma separação ou retenção de fases prévia à quantificação, envolvendo por exemplo, processos de filtração, centrifugação e de diálise, seguidos da determinação quantitativa do soluto numa e noutra fase recorrendo a técnicas, por exemplo, espectroscópicas. Os principais métodos directos são o método potenciométrico, a espectroscopia UV-Vis e a espectroscopia NMR (ressonância magnética nuclear) que fornece um conjunto de informações moleculares para avaliar a partição membranar (van Balen *et alii.*, 2004). Os métodos indirectos apoiam-se principalmente nos métodos de diálise e cromatográficos (Mansilha, 2002). Os métodos cromatográficos podem ser diferenciados em cromatografia de membrana artificial imobilizada (IAM), cromatografia de lipossomas imobilizados (ILC), electroforese capilar lipossomal (LCE), entre outros (Burns e Khaledi, 2002).

Muitos dos métodos indirectos de obtenção de coeficientes de partição são penosos e laboriosos e causam, com frequência, perturbações no estado de equilíbrio das amostras, alterando os valores de  $P_{L/A}$  obtidos (Dipali *et alii.*, 1996). Estes métodos são, mesmo assim, usuais, tendo sido os primeiros a serem usados para determinar  $P_{L/A}$ . Assim, a principal vantagem dos métodos directos é o facto de não ocorrer alteração do sistema em estudo, respeitando os equilíbrios químicos estabelecidos entre as moléculas que o constituem (Mansilha, 2002).

#### **4.4.1. Métodos directos**

As titulações potenciométricas são usadas para determinar os coeficientes de partição e de distribuição de compostos ionizáveis tanto em sistemas isotrópicos como em anisotrópicos (Clarke e Cahoon, 1996). É um método contínuo e fornece um perfil de lipofilicidade dos solutos ionizáveis no sistema de partição.

O comportamento de partição dos compostos ionizáveis, num sistema bifásico, é obtido pelo equilíbrio de dissociação entre as duas fases e o equilíbrio de partição de todas as espécies ionizadas. Esta técnica engloba os valores de  $pK_a$  e os valores de  $P_{L/A}$  dos solutos ionizáveis. A substância presente na fase aquosa é titulada contra um ácido

ou base padrão de forma a deduzir-se a constante de ionização. A titulação é repetida no sistema bifásico (lipossoma/água), obtendo-se a constante de ionização aparente ( $pK_a^{app}$ ), que pode variar em relação a primeira titulação, e essa mesma variação é usada para calcular o  $P_{L/A}$  (Krämer *et alii.*, 1998). A principal vantagem do método potenciométrico é a possibilidade de usar vários solventes e de medir um grande intervalo de valores de  $P_{L/A}$ . No entanto, a titulação potenciométrica possui certas limitações. Em primeiro lugar, impõe-se o rigor da técnica laboratorial. Seguidamente, o soluto deve estar completamente solubilizado nas duas fases. O método potenciométrico está limitado a compostos com valores de  $P_{L/A}$ , compreendidos aproximadamente entre -0,5 e 4 (van Balen *et alii.*, 2004).

A espectroscopia de UV-Vis é um método que usa as variações espectrais inerentes de cada composto (absortividade molar,  $\epsilon$  e/ou comprimento de onda  $\lambda$ ) para a determinação dos coeficientes de partição, após a sua localização num meio com diferente polaridade (Kitamura *et alii.*, 1995). A principal vantagem da espectroscopia é a sensibilidade do método. Adicionalmente, a maioria dos compostos possui propriedades espectroscópicas facilmente mensuráveis, dependentes da natureza química do meio e proporcionais à concentração do composto em cada uma das fases (Mansilha, 2002).

Embora este método apresente diversas vantagens, a presença de estruturas micro-heterogêneas de tamanho não negligenciável, como os lipossomas, causa dispersão da luz, que se acentua a comprimentos de onda inferiores a 300 nm, resultando na diminuição de luz que atinge o detector (Mello, 2007). A intensidade dos sinais do ruído, presentes neste sistema bifásico, dificulta a análise das variações da absorvância dos compostos e estes dependem principalmente da concentração dos agregados moleculares e da sua dimensão. Este problema é resolvido, quando se remove os lipossomas por centrifugação, filtração por membranas, diálise ou cromatografia em coluna de forma obter soluções límpidas. No entanto, essas metodologias são laboriosas e podem perturbar o equilíbrio do sistema (Mansilha, 2002).

A subtração de um branco surge como primeira opção para reduzir tais interferências. Contudo estas só são geralmente eliminadas após aplicação da segunda derivada aos sinais registados. Deste modo, surge o conceito de espectroscopia diferencial ou derivativa, na qual, as alterações espectrais possuem melhor resolução,



bem como a eliminação dos efeitos dos sinais de ruído, sem necessidade de se recorrer a técnicas de separação de fases (El-Sayed e El-Salem, 2005). A espectroscopia derivativa permite evidenciar detalhes de forma a determinar o valor do comprimento de onda correspondente à máxima absorção ( $\lambda_{\text{máx.}}$ ). Desta forma, as medições obtidas são determinadas sem interferência nos equilíbrios estabelecidos, obtendo-se uma melhor resolução das bandas sobrepostas e uma eliminação de interferências espectrais (Rodrigues *et alii.*, 2001; Gürsoy *et alii.*, 2004).

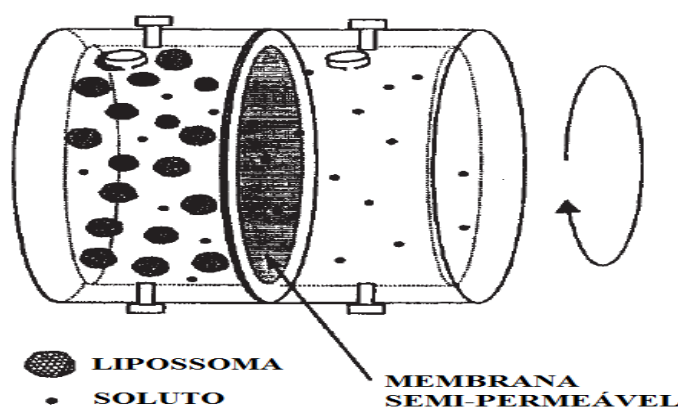
Segundo Fruttero (2007), a espectroscopia NMR, embora diferente da análise potenciométrica, é o método mais informativo no estudo das interações entre o soluto e a membrana. Existem dois tipos de espectroscopia NMR, sendo uma de linha ampla e a outra de alta resolução. O método de linha ampla é levada a cabo em cristais, fosfolípidos não sonificados ou em grandes vesículas de lípidos no estado de gel ou cristal-líquido, fornecendo informação sobre a localização na membrana das várias espécies eléctricas de um composto, e sobre as alterações na ordem e dinâmica molecular dos fosfolípidos quando interagem com o composto. Por outro lado, a espectroscopia NMR de alta resolução é realizada em dispersões aquosas de pequenas vesículas de fosfolípidos. O método de NMR possui uma boa precisão, sendo mais rápido que o método de diálise, mas mais lento que a técnica potenciométrica (van Balen *et alii.*, 2004).

#### **4.4.2. Métodos indirectos**

Mason e colaboradores (1989) aplicaram o método da agitação ao sistema lipossoma/água para determinar coeficientes de partição, envolvendo o uso da centrifugação para a separação dos lipossomas da fase aquosa. Contudo, com este método a separação não é completa e a co-precipitação de moléculas de soluto livre presentes na fase aquosa pode ocorrer. A técnica de diálise não apresenta tais limitações sendo hoje em dia largamente utilizada para medir coeficientes de partição entre lipossomas e água (van Balen *et alii.*, 2004).

No método de diálise, uma suspensão lipossomal e a fase aquosa estão separadas por uma membrana semi-permeável, o que permite unicamente a passagem de moléculas de soluto, retendo os lipossomas (Figura 10) (Krämer *et alii.*, 1997; Krämer *et alii.*, 1998). Inicialmente, o soluto encontra-se num dos dois compartimentos. Assim

que se atinge o equilíbrio entre as duas fases, a concentração do soluto em ambos compartimentos pode ser determinada e o  $P_{L/A}$  calculado. Segundo Wimley e White (1993), a quantificação da concentração do soluto é realizada através de métodos padronizados como análise espectroscópica, derivatização química ou através do uso de marcadores radioactivos. A concentração de soluto presente nos lipossomas pode ser calculada entre a concentração inicial e final na fase aquosa, assumindo que a concentração entre a fase tampão externa e a fase tampão no interior dos lipossomas sejam a mesma (van Balen *et alii.*, 2001).



**Figura 10.** Representação esquemática do método de diálise (adaptado de van Balen *et alii.*, 2004).

Este método é, no entanto, bastante laborioso, demorado e economicamente dispendioso (Wimley e White, 1993). As condições experimentais, como a concentração lipídica e a proporção molar lípido/soluto, devem ser geralmente optimizadas para cada soluto. Esta técnica permite obter informação sobre a afinidade do soluto para os fosfolípidos, mas não no seu modo de interacção e localização na membrana.

Interacções entre membranas lipídicas e moléculas de interesse terapêutico têm sido ao longo do tempo intensamente estudadas através de técnicas cromatográficas. Pidgeon e Venkataram (1989) relataram o uso da cromatografia em membranas artificiais, nas quais a monocamada lipídica se encontrava covalentemente ligada a esferas de sílica gel. Deste modo, surge o conceito da cromatografia com membranas

artificiais imobilizadas (IAM). Esta técnica, comparada com o sistema lipossoma/água, foi considerada mais simples (Ong *et alii.*, 1996).

Posteriormente, os lipossomas foram, por sua vez, imobilizados em esferas de gel no processo cromatográfico, funcionando como fase estacionária depois de empacotados numa coluna cromatográfica (Lundahl e Beigi, 1997; Yang *et alii.*, 1998). Assim sendo, interações entre o soluto e a membrana, bem como a determinação do  $P_{L/A}$ , podem ser avaliadas de forma precisa, recorrendo a cromatografia de lipossomas imobilizados (ILC) (Lundqvist e Lundahl, 1997; Yang *et alii.*, 1999; Yang *et alii.*, 1999; Yoshimoto *et alii.*, 2006).

Neste método, o coeficiente de partição é calculado através do factor de capacidade obtido a partir do volume de retenção e da quantidade de fosfolípidos imobilizados, fornecendo informação sobre as interações entre os lípidos e as substâncias estudadas (Beigi *et alii.*, 1998; Boija e Johansson, 2006; Hartmann e Schmitt, 2004). Fármacos com grupos ionizáveis podem encontrar-se carregados electricamente a pH fisiológico, podendo desta forma afectar a sua interacção com a membrana biológica. Este fenómeno pode levar a alterações dependentes do pH nas interações fármaco/membrana. De forma a simular esse efeito na ILC, lípidos carregados podem ser introduzidos na bicamada lipídica dos lipossomas (Lundahl e Beigi, 1997). Este método é conveniente uma vez que as membranas permanecem estáveis durante meses e a análise é bastante rápida.

No método da electroforese capilar lipossomal (LCE), os lipossomas estão incluídos num tampão aquoso, dentro de um tubo capilar, funcionando como fase pseudo-estacionária durante a migração electroforética dos solutos (Zhang *et alii.* 1995). A diminuição da mobilidade dos fármacos carregados electricamente na presença de lipossomas reflecte as interações fármaco/lipossoma que pode ser quantificada através do factor de capacidade. A resolução desta técnica é superior à da cromatografia em lipossomas imobilizados (ILC), necessita de menores quantidades de lipossomas e de fármaco e é mais rápido (Mei *et alii.*, 2008; Wiedmer *et alii.*, 2008). Este método fornece vantagens alargadas no estudo das interações entre fármacos e membranas. A única desvantagem desta técnica é a existência de uma janela de eluição que limita o intervalo dinâmico para solutos neutros. No entanto, para solutos carregados este

problema pode ser facilmente resolvido, usando lipossomas carregados neutralmente (Burns e Khaledi, 2002).

Dentro do contexto das membranas lipídicas imobilizadas num suporte sólido para quantificar a partição de um fármaco, surge uma ferramenta alternativa desenvolvida pelos laboratórios de biotecnologia Nimbus, disponível comercialmente sob o nome de TRANSIL<sup>®</sup> (Vergères *et alii.*, 1995; Loidl-Stahlhofen *et alii.*, 1996; Hartmann e Schmitt, 2004). Neste sistema, a membrana lipossomal envolve esferas de sílica porosa através de ligações não covalentes. A orientação e a fluidez dos lípidos são comparáveis às dos lipossomas e a boa correlação dos coeficientes de partição entre o sistema lipossoma/água e o sistema TRANSIL<sup>®</sup> já foram relatadas (Loidl-Stahlhofen *et alii.*, 2001; Loidl-Stahlhofen *et alii.*, 2001). A principal vantagem desta técnica é de ser completamente automatizada.

## V. Correlação dos coeficientes de partição octanol/lipossoma e actividades farmacológicas

A correlação entre os coeficientes de distribuição obtidos com octanol e lipossoma foi analisada consoante as cargas dos compostos. Assim sendo, foi dividida em compostos neutros, com carga negativa (ácidos), com carga positiva (bases) e, ainda, em compostos com carga positiva, negativa ou ambos que se encontrem parcialmente ionizadas. A maioria dos fármacos são absorvidos no intestino delgado, cujo pH varia entre 5 e 8, daí os valores de  $\log D$  retirados para este trabalho se inseriram entre 6,8 e 7,4, valores entre os quais a permeabilidade membranar é máxima (Zhu *et alii.*, 2002).

O grau de ionização de cada composto é calculado através dos valores de  $pK_a$  de cada um deles e o respectivo pH ao qual os valores de partição foram determinados. Para calcular a percentagem de ionização, foram utilizadas as seguintes equações, dependendo se os compostos eram ácidos ou básicos:

$$\% \text{ ionização (ácidos)} = 100 - \frac{100}{1 + \text{antilog}(pH - pKa)} \quad (\text{Equação 1})$$

$$\% \text{ ionização (bases)} = \frac{100}{1 + \text{antilog}(pH - pKa)} \quad (\text{Equação 2})$$

Como medida de actividade farmacológica, foi considerado o  $F_a$  (%), que consiste na fracção de fármaco absorvida que atinge a corrente sanguínea numa dose administrada oralmente. O comportamento da maioria dos fármacos, bem absorvidos ( $F_a > 70\%$ ) por transporte passivo transcelular *in vivo*, é correctamente previsto através dos coeficientes de partição (Liu *et alii.*, 2002). A fracção de fármaco absorvida é um parâmetro importante, isto porque a primeira etapa para obter uma boa biodisponibilidade oral, por consequente actividade terapêutica, é uma boa absorção oral (Kotecha *et alii.*, 2008).

O conjunto de dados apresentados seguidamente, que inclui sessenta e seis compostos, foi recolhido de diversas referências bibliográficas.

### 5.1. Correlação de fármacos neutros

Para esta análise, foram considerados neutros todos os compostos que são estruturalmente neutros ou que, sendo ácidos ou bases, possuem um grau de ionização inferior ou igual a 10 % (Tabela 2).

**Tabela 2.** Lista de diversos fármacos neutros com respectivos valores de  $pK_a$ ,  $\log D_{L/A}$ ,  $\log D_{O/A}$  e Fa (%).

Fármaco	$pK_a$ <sup>a</sup>	Carga <sup>*</sup>	pH	% Ionização	$\log D_{L/A}$ <sup>b</sup>	$\log D_{O/A}$ <sup>c</sup>	Fa (%) <sup>d</sup>
<b>Teofilina</b>	8,60	N	7,4	6	0,58	-0,02	97
<b>Paracetamol</b>	9,41	N	7,4	1	0,95	0,51	80
<b>Hidrocortisona</b>	-	N	7,4	0	2,21	1,48	91
<b>Cloranfenicol</b>	11,03	N	7,4	0	2,28	1,14	90
<b>Corticosterona</b>	-	N	7,4	0	2,64	1,78	100
<b>Olanzapina</b>	5,44	N	6,8	4	3,00	2,00	75
<b>Fenitoína</b>	7,94	N	7,0	10	3,05	2,63	90
<b>Nifedipina</b>	-	N	7,4	0	3,50	3,22	90
<b>Diazepam</b>	3,45	N	7,0	0	3,58	2,92	97

\*N - Neutro

**a** - (Balon *et alii.*, 1999; Österberg *et alii.*, 2001; Liu *et alii.*, 2002; Taillardat-Bertschinger *et alii.*, 2002; Block *et alii.*, 2004; Shalaeva *et alii.*, 2008)

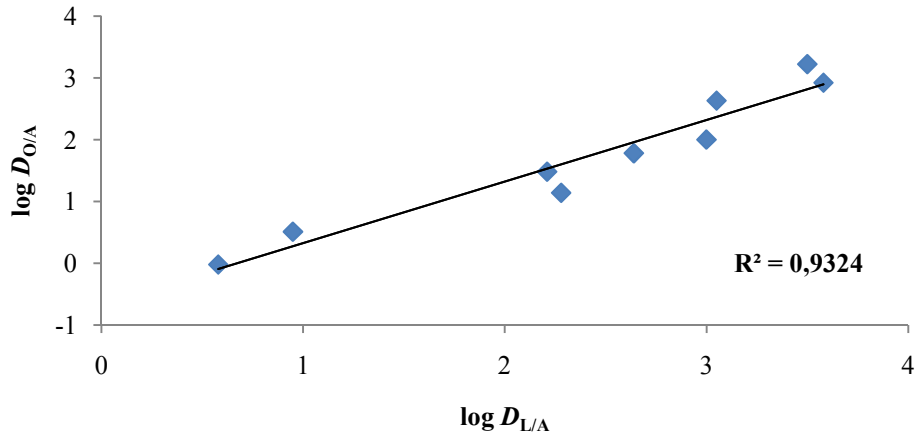
**b** - (Balon *et alii.*, 1999; Loidl-Stahlhofen *et alii.*, 2001; Liu *et alii.*, 2002; Taillardat-Bertschinger *et alii.*, 2002)

**c** - (Balon *et alii.*, 1999; Taillardat-Bertschinger *et alii.*, 2002; Zhu *et alii.*, 2002; Barbato *et alii.*, 2004; Hou *et alii.*, 2004; Flaten *et alii.*, 2006)

**d** - (Österberg *et alii.*, 2001; Zhu *et alii.*, 2002; Sanghvi *et alii.*, 2003; Hou *et alii.*, 2007).

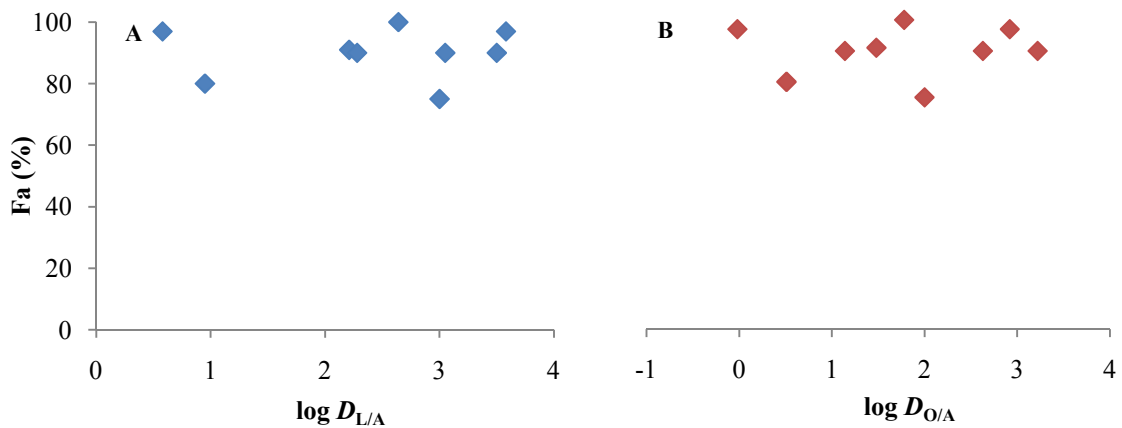
Como a maioria dos fármacos podem ser ionizados, foi usado o valor de  $\log D$  e calculado o grau de ionização através das equações 1 e 2. Os valores de  $\log D$  variam entre 0,58 e 3,58, nos lipossomas, e entre -0,02 e 3,22 para o octanol (Tabela 2).

Ao comparar o  $\log D_{L/A}$  com o  $\log D_{O/A}$  (Gráfico 1), uma correlação linear é revelada ( $R^2 = 0,9324$ ). Este resultado deve-se ao facto dos fármacos neutros se particionarem nos dois sistemas unicamente através de ligações hidrófobas e de hidrogénio, não existindo as possíveis interacções electrostáticas que os lipossomas são capazes de estabelecer.



**Gráfico 1.** Correlação dos coeficientes de distribuição octanol vs lipossoma de fármacos neutros.

A relação entre os dois parâmetros de lipofilia, nomeadamente partição em lipossomas e octanol, e a fracção de fármaco absorvida, é evidenciada nos gráficos 2A e 2B para o sistema lipossoma e octanol, respectivamente. O resultado obtido é semelhante para ambos os modelos. Verifica-se uma absorção satisfatória para todos os fármacos em estudo no intervalo de  $\log D$  apresentado.



**Gráfico 2.** Correlação entre  $\log D_{L/A}$  e Fa (%) (A) e entre  $\log D_{O/A}$  e Fa (%) (B) de fármacos neutros.

Pode-se verificar que, no caso dos lipossomas, se evidencia um agrupamento de fármacos para valores de  $\log D_{L/A}$  entre 2,21 e 3,58, indicando um intervalo óptimo de lipofilia para uma elevada absorção. No caso do octanol, não se verifica um intervalo óptimo de lipofilia, sendo os fármacos todos absorvidos satisfatoriamente ao longo do intervalo de  $\log D_{O/A}$ . Ambos os modelos mostram uma elevada capacidade de previsão de absorção para este conjunto de compostos neutros.

## 5.2. Correlação de fármacos com carga negativa (ácidos)

Nesta parte do trabalho, são considerados todos os fármacos ácidos com um grau de ionização superior a 90 %, possuindo carga negativa. No entanto, todos eles apresentam um grau de ionização superior a 99 % (Tabela 3).

**Tabela 3.** Lista de diversos fármacos negativos com respectivos valores de  $pK_a$ ,  $\log D_{L/A}$ ,  $\log D_{O/A}$  e Fa (%).

Fármaco	$pK_a$ <sup>a</sup>	Carga	pH	% Ionização	$\log D_{L/A}$ <sup>b</sup>	$\log D_{O/A}$ <sup>c</sup>	Fa (%) <sup>d</sup>
Antipirina	1,21	-	7,4	100	0,44	0,34	100
Ác. Acetilsalicílico	3,41	-	6,8	100	0,65	-2,00	98
Ác. 5-fenilvalérico	4,88	-	7,4	100	0,90	-0,02	-
Ác. Salicílico	2,97	-	7,4	100	0,95	-0,90	100
Furosemida	3,61	-	6,8	100	0,72	-1,00	6
Varfarina	4,90	-	7,4	100	1,55	0,59	97
Sulindac	4,26	-	7,4	100	1,60	-0,66	90
Naproxeno	4,84	-	7,4	100	1,68	0,03	98
Xipamida	4,28	-	6,8	99	1,70	0,50	70
Oxaprozina	4,19	-	7,4	100	1,99	-0,30	97
Flurbiprofeno	4,27	-	7,4	100	2,04	0,92	95
Ibuprofeno	4,45	-	6,8	100	2,10	0,68	93
Diclofenac	4,01	-	6,8	100	2,90	1,40	90
Indometacina	4,46	-	7,4	100	3,16	-0,89	100
Sulfassalazina	2,40/9,70/ 11,80	-	7,4	100	3,16	-0,63	12
Proxicromil	1,93	-	7,4	100	3,85	0,85	-

a - (Barbato *et alii.*, 1997; Balon *et alii.*, 1999; Castro *et alii.*, 2001; Österberg *et alii.*, 2001; Wan *et alii.*, 2003; Block *et alii.*, 2004; Mei *et alii.*, 2008)

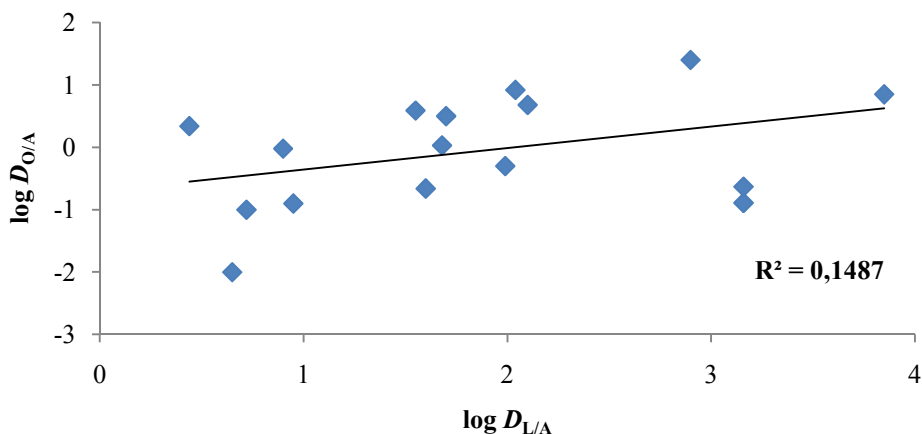
b - (Balon *et alii.*, 1999; Castro *et alii.*, 2001; Österberg *et alii.*, 2001; Burns e Khaledi, 2002; Liu *et alii.*, 2002; Mei *et alii.*, 2008)

c - (Mukherjee *et alii.*, 1996; Barbato *et alii.*, 1997; Balon *et alii.*, 1999; Österberg *et alii.*, 2001; Valko *et alii.*, 2003; Hou *et alii.*, 2004; Block *et alii.*, 2004)

d - (Yoshida e Topliss, 2000; Österberg *et alii.*, 2001; Zhu *et alii.*, 2002; Sanghvi *et alii.*, 2003 ; Pérez *et alii.*, 2004).



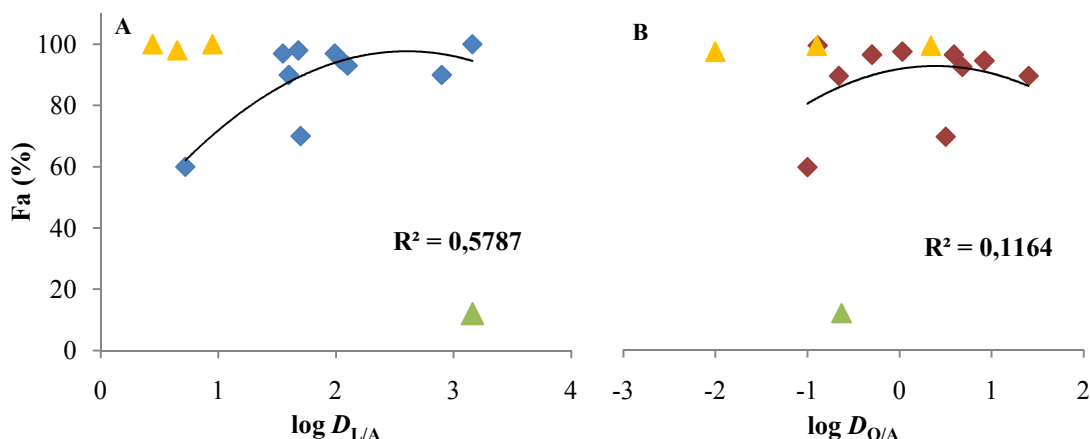
Todos estes compostos sofrem ionização, sendo o seu grau calculado pela equação 1. Os valores de  $\log D$  variam entre 0,44 e 3,85, nos lipossomas, e entre -2,00 e 1,40 para o octanol (Tabela 3). Ao comparar o  $\log D_{L/A}$  com o  $\log D_{O/A}$  (Gráfico 3), nenhuma correlação linear é verificada ( $R^2 = 0,1487$ ).



**Gráfico 3.** Correlação dos coeficientes de distribuição octanol vs lipossoma de fármacos carregados negativamente (ácidos).

É possível verificar que a partição de aniões foi superior, em pelo menos 1,12 unidades, no sistema lipossomal excepto para a antipirina, ácido 5-fenilvalérico e varfarina, e em média 1,91 unidades acima do que no octanol.

A comparação entre os coeficientes de distribuição dos lipossomas e octanol é, por sua vez, relacionada com a fracção de fármaco absorvida, sendo evidenciada nos gráficos 4A para o modelo lipossomal e 4B para o modelo do octanol. Em ambos os gráficos (4A e 4B), não são considerados compostos com peso molecular (PM) inferior a 200, sendo o caso da antipirina, ácido salicílico e ácido acetilsalicílico, nem a sulfasalazina, a qual possui uma baixa absorção oral. Explicações mais detalhadas serão dadas na discussão.



**Gráfico 4.** Correlação entre  $\log D_{L/A}$  e Fa (%) (A) e entre  $\log D_{O/A}$  e Fa (%) (B) de fármacos carregados negativamente (ácidos). Os triângulos amarelos correspondem aos compostos com PM < 200 (antipirina, ácido salicílico e ácido acetilsalicílico). O triângulo verde corresponde a sulfassalazina.

Para ambos os modelos, é possível observar uma curva hiperbólica, no entanto, os lipossomas (4A) mostram uma melhor relação com o Fa, apresentando um  $R^2$  de 0,5787 enquanto que o octanol (4B) possui um valor de  $R^2$  de 0,1164. A curva do modelo lipossomal é bem mais acentuada que a curva obtida com o octanol. É possível observar um intervalo ótimo nos valores de  $\log D_{L/A}$  para a passagem dos fármacos pelas biomembranas, em que o aumento da absorção está relacionado com a lipofilia. Esse intervalo está compreendido entre valores de  $\log D_{L/A}$  de 1,55 e 3,16. No caso do octanol, não se verifica um intervalo tão acentuado nem uma dependência da absorção com a lipofilia, no entanto, demonstra uma boa absorção para valores de  $\log D_{O/A}$  entre -0,89 e 1,4.

Também é possível verificar que, mesmo para os fármacos com PM < 200 e elevada absorção, o modelo lipossomal atribui-lhes um intervalo específico de valores de  $\log D$ , entre 0,44 e 0,95, contrariamente ao octanol.

### 5.3. Correlação de fármacos com carga positiva (bases)

Seguidamente, são apresentados os fármacos básicos, possuindo carga positiva, com um grau de ionização superior a 90 %, sendo considerados, por conseguinte, completamente ionizados (Tabela 4).

**Tabela 4.** Lista de diversos fármacos positivos com respectivos valores de  $pK_a$ ,  $\log D_{L/A}$ ,  $\log D_{O/A}$  e  $Fa$  (%).

Fármaco	$pK_a$ <sup>a</sup>	Carga	pH	% Ionização	$\log D_{L/A}$ <sup>b</sup>	$\log D_{O/A}$ <sup>c</sup>	$Fa$ (%) <sup>d</sup>
Atenolol	9,25	+	6,8	100	1,00	-1,30	52
Tiamenidina	9,30	+	7,4	99	1,02	-0,17	-
Terbutalina	9,12/9,33	+	7,4	99	1,12	-1,67	68
Tetrahidrozolina	10,42	+	7,4	100	1,15	0,02	-
Clonidina	8,11	+	7,0	93	1,29	0,06	96
Metoprolol	9,63	+	7,0	100	1,59	-1,32	95
Procaína	9,03	+	7,0	99	1,62	0,02	-
Pindolol	9,70	+	7,4	100	1,76	-0,55	92
Acebutolol	9,52	+	7,0	100	1,93	-0,99	90
Oximetazolina	11,96/10,53	+	7,4	100	1,94	-0,32	-
Xilometazolina	10,20	+	7,4	100	1,94	0,40	-
Oxprenolol	9,57	+	7,0	100	2,09	-0,72	97
Fluoxetina	9,62	+	6,8	100	2,10	1,90	80
Rilmenidina	9,22	+	7,0	99	2,11	-0,60	97
4-fenilbutilamina	10,42	+	7,4	100	2,12	-0,62	-
Metipranolol	9,54	+	7,0	100	2,27	0,38	-
Nicotina	8,00	+	7,0	91	2,30	0,33	100
Alprenolol	9,59	+	7,0	100	2,33	0,40	94
Propanolol	9,14	+	6,8	100	2,50	1,20	93
Diltiazem	8,91	+	7,4	97	2,55	2,22	92
Timolol	9,53	+	7,0	100	1,40	-0,30	90
Imipramina	9,34	+	7,0	100	2,83	1,82	99
Penbutolol	9,92	+	7,0	100	3,39	1,85	100
Amlodipina	9,02	+	7,4	98	3,75	1,11	70

a - (Österberg *et alii.*, 2001; Balon *et alii.*, 1999; Choi e Rogers, 1990; Taillardat-Bertschinger *et alii.*, 2002; Block *et alii.*, 2004)

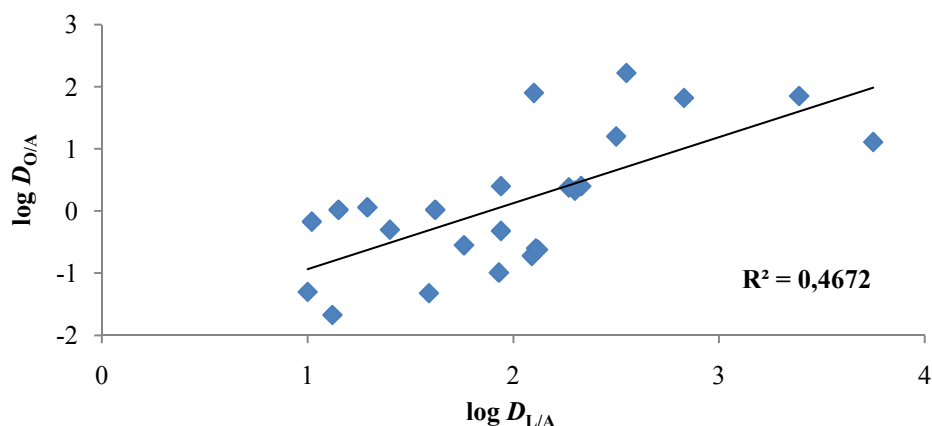
b - (Choi e Rogers, 1990; Balon *et alii.*, 1999; Liu *et alii.*, 2001; Österberg *et alii.*, 2001; Liu *et alii.*, 2002; Taillardat-Bertschinger *et alii.*, 2002)

c - (Choi e Rogers, 1990; Ishihama *et alii.*, 1996; Balon *et alii.*, 1999; Yoshida e Topliss, 2000; Österberg *et alii.*, 2001; Taillardat-Bertschinger *et alii.*, 2002; Hou *et alii.*, 2004)

d - (Österberg *et alii.*, 2001; Zhu *et alii.*, 2002; Sanghvi *et alii.*, 2003; Remko *et alii.*, 2006; Hou *et alii.*, 2007)

Também foram calculados os graus de ionização destes compostos através da equação 2 e estes situam-se entre 91 % e 100 %. Os valores de  $\log D$  incluem-se entre 1,00 e 3,75, nos lipossomas, e entre -1,67 e 2,22 no octanol (Tabela 4).

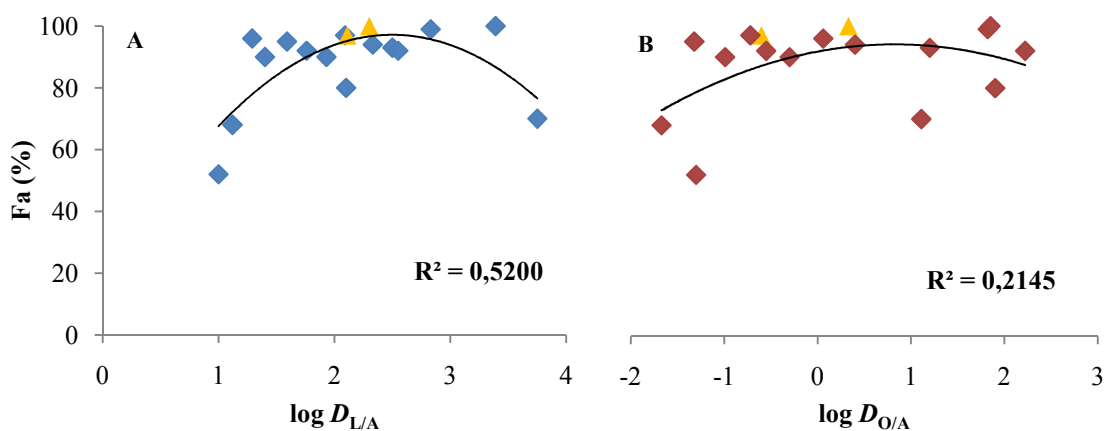
À semelhança dos resultados obtidos entre o  $\log D_{L/A}$  e o  $\log D_{O/A}$  dos fármacos carregados negativamente, também não se verifica nenhuma correlação linear explícita ( $R^2 = 0,4672$ ) para os fármacos carregados positivamente (Gráfico 5).



**Gráfico 5.** Correlação dos coeficientes de distribuição octanol vs lipossoma de fármacos carregados positivamente (bases).

Neste caso, a partição de catiões foi superior, em pelo menos, 1,13 unidades no sistema lipossomal excepto para a fluoxetina, diltiazem e imipramida e em média 1,87 unidades acima do que no octanol.

Por sua vez, os valores de  $\log D_{L/A}$  e  $\log D_{O/A}$  também foram relacionados com a fracção de fármaco absorvida para o grupo de fármacos consideradas bases, ou seja, que possuem carga positiva. O resultado é visível no gráfico 6, quer para o modelo lipossomal (A), quer para o modelo do octanol (B). Tal como sucedeu no caso dos compostos negativos, também não foram considerados compostos com  $PM < 200$ , sendo o caso da rilmenidina e da nicotina.



**Gráfico 6.** Correlação entre  $\log D_{L/A}$  e Fa (%) (A) e entre  $\log D_{O/A}$  e Fa (%) (B) de fármacos carregados positivamente (bases). Os triângulos amarelos correspondem aos compostos com  $PM < 200$  (rilmenidina e nicotina).

É possível observar uma relação hiperbólica em ambos os modelos. No entanto, e à semelhança do resultado obtido com os fármacos carregados negativamente, aqui também se verifica uma melhor correlação da absorção com o modelo lipossomal do que com o octanol. A curva do gráfico 6A é mais acentuada ( $R^2 = 0,5200$ ) e apresenta um valor de  $\log D_{L/A}$  ótimo entre 1,29 e 3,39, correspondente a uma melhor absorção. Por outro lado, a curva do gráfico correspondente ao octanol (6B) é menos acentuada ( $R^2 = 0,2145$ ) e não apresenta um intervalo claro em que o valor do  $\log D_{O/A}$  corresponda a uma absorção máxima. A melhor capacidade de previsão de absorção dos fármacos obtida através do modelo lipossomal já tinha sido demonstrada com os compostos carregados negativamente (Capítulo 5.2).

Verifica-se novamente que, para os compostos com  $PM < 200$  e elevada absorção, o modelo lipossomal atribui-lhes um intervalo específico de valores de  $\log D$ , entre 2,11 e 2,30, contrariamente ao octanol. Tal facto, já tinha sido evidenciado nos compostos negativos.

#### **5.4. Correlação de fármacos parcialmente ionizados**

Em relação aos fármacos parcialmente ionizados, a classificação é mais ampla, pois são considerados todos os fármacos ácidos, básicos ou anfotéricos que possuem um grau de ionização compreendido entre 11 % e 89 %. Alguns desses mesmos fármacos apresentam a carga negativa e positiva simultaneamente, sendo assim zwitteriônicos (Z) (Tabela 5).

Foram novamente usados as equações 1 e 2 para calcular o grau de ionização destes compostos. Os valores de  $\log D$  recolhidos encontram-se entre -0,60 e 4,71, nos lipossomas, e entre -2,52 e 5,50 no octanol. A relação entre os valores de  $\log D$  para os dois modelos é mostrada no gráfico 7.

**Tabela 5.** Lista de diversos fármacos parcialmente ionizados com respectivos valores de  $pK_a$ ,  $\log D_{L/A}$ ,  $\log D_{O/A}$  e Fa (%).

Fármaco	$pK_a$ <sup>a</sup>	Carga <sup>*</sup>	pH	% Ionização	$\log D_{L/A}$ <sup>b</sup>	$\log D_{O/A}$ <sup>c</sup>	Fa (%) <sup>d</sup>
Paromomicina	5,99	+	6,8	13	-0,60	-2,00	3
Amoxicilina	2,40/7,40/9,60	50Z/50-	7,4	50Z/50-	-0,27	-1,69	93
Ampicilina	2,66/7,24	40Z/60-	7,4	40Z/60-	0,04	-1,80	45
Cefalexina	2,61/7,08	32Z/68-	7,4	32Z/68-	0,21	-2,52	96
Levofloxacina	5,50/8,00	79Z/21-	7,4	79Z/21-	0,44	-0,40	80
Cimetidina	6,90	+	7,4	24	0,89	0,35	93
Moxonidina	7,36	+	6,8	78	1,50	0,40	99
Zopiclone	6,76	+	6,8	48	1,60	1,30	80
Cirazolina	6,50	+	7,4	11	1,72	0,53	-
Prilocaina	9,00	+	7,4	62	1,82	1,40	-
Mepivacaína	7,60	+	7,4	58	1,79	1,32	-
Lidocaína	7,90	+	7,4	76	1,76	1,65	-
Fenobarbital	7,20	-	7,0	39	2,15	1,29	95
Miconazol	6,12	+	6,8	17	3,60	4,50	99
Indacaterol	6,70/8,30	83Z/5+	7,4	83Z/5+	3,69	3,51	-
Terbinafina	7,05	+	6,8	64	4,60	5,50	80
Rifampicina	7,90	-	7,4	24	4,71	4,24	80

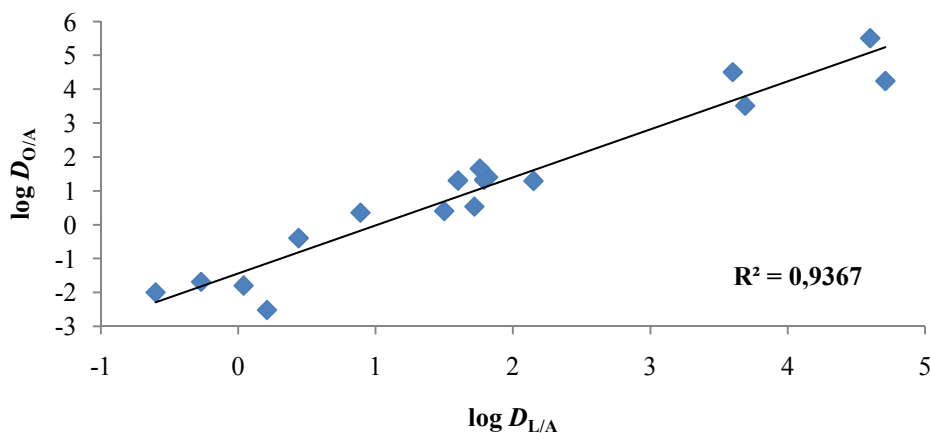
\*Z - Zwitteriônico

a - (Brasili *et alii.*, 1995; Balon *et alii.*, 1999; Österberg *et alii.*, 2001; Hirota *et alii.*, 2001; Rodrigues *et alii.*, 2001; Taillardat-Bertschinger *et alii.*, 2002; Vieira *et alii.*, 2003; Block *et alii.*, 2004; Malheiros *et alii.*, 2004; Flaten *et alii.*, 2006; Shalaeva *et alii.*, 2008)

b - (Choi e Rogers, 1990; Balon *et alii.*, 1999; Österberg *et alii.*, 2001; Rodrigues *et alii.*, 2001; Taillardat-Bertschinger *et alii.*, 2002; Malheiros *et alii.*, 2004; Flaten *et alii.*, 2006; Lombardi *et alii.*, 2009)

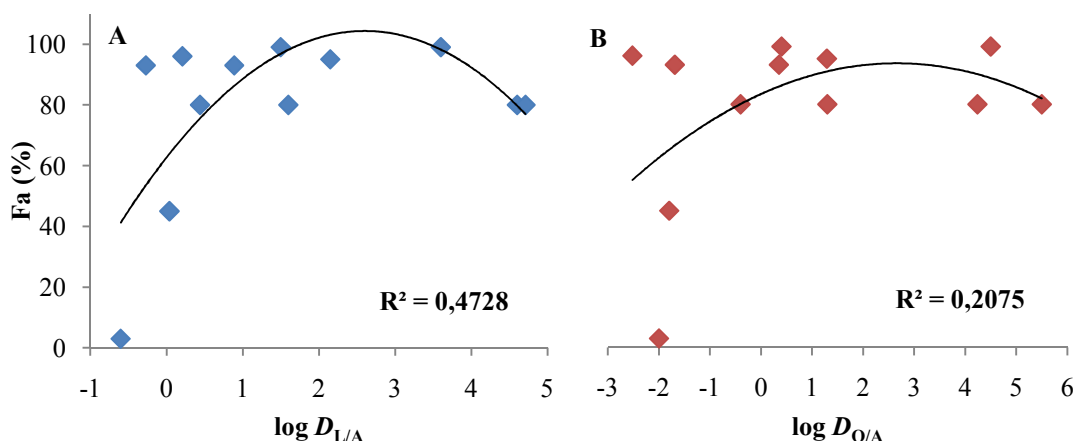
c - (Choi e Rogers, 1990; Frick *et alii.*, 1998; Balon *et alii.*, 1999; Österberg *et alii.*, 2001; Rodrigues *et alii.*, 2001; Liu *et alii.*, 2002; Taillardat-Bertschinger *et alii.*, 2002; Zhu *et alii.*, 2002; Valko *et alii.*, 2003; Lombardi *et alii.*, 2009; Werdehausen *et alii.*, 2009)

d - (Molero-Monfort *et alii.*, 2001; Liu *et alii.*, 2002; Zhu *et alii.*, 2002; Sanghvi *et alii.*, 2003; Pérez *et alii.*, 2004)

**Gráfico 7.** Correlação dos coeficientes de distribuição octanol vs lipossoma de fármacos parcialmente ionizados.

Contrariamente ao esperado, o resultado obtido sobre a correlação entre os valores de  $\log D_{L/A}$  e  $\log D_{O/A}$  para os fármacos parcialmente ionizados assemelha-se ao resultado obtido para os compostos neutros. O resultado obtido (Gráfico 7) mostra uma correlação linear satisfatória entre os dois modelos em que o  $R^2$  obtido é de 0,9367.

No que diz respeito à correlação dos coeficientes de partição com os respectivos valores de  $F_a$  (Gráfico 8), esta não se assemelha ao resultado observado no caso dos compostos neutros. Neste grupo de fármacos, verifica-se uma melhor correlação com os lipossomas (8A) do que com o octanol (8B).



**Gráfico 8.** Correlação entre  $\log D_{L/A}$  e  $F_a$  (%) (A) e entre  $\log D_{O/A}$  e  $F_a$  (%) (B) de fármacos parcialmente ionizados.

De facto, o modelo lipossomal apresenta uma curvatura mais pronunciada ( $R^2 = 0,4728$ ), contrariamente ao observado no octanol ( $R^2 = 0,2075$ ). Esta diferença entre os dois sistemas não era tão grande nos compostos neutros, indicando assim, que as interacções electrostáticas entre solutos carregados e os fosfolípidos das membranas desempenham um papel mais importante do que as ligações hidrófobas e ligações de hidrogénio no que diz respeito a sua partição.

## **VI. Discussão**

A análise dos gráficos referentes à correlação entre os lipossomas e o octanol dos fármacos neutros permite observar uma correlação satisfatória entre os valores de  $\log D_{L/A}$  e de  $\log D_{O/A}$  (Gráfico 1) com um  $R^2$  de 0,9324. Este resultado é esperado e já relatado em diversos estudos (Avdeef *et alii.*, 1998; Balon *et alii.*, 1999; Rodrigues *et alii.*, 2001), uma vez que os compostos neutros particionam exclusivamente através de ligações hidrófobas e de hidrogénio. Wang e colaboradores (2007) também apresentaram recentemente um trabalho no qual obtêm o mesmo resultado. No entanto, no seu estudo recorrem ao  $\log P$  em vez do  $\log D$ , que em nada altera o resultado uma vez que se tratam de compostos neutros. Este resultado implica também que tanto os lipossomas, como o octanol não são discriminatórios em relação a baixa ou elevada lipofilia dos compostos neutros.

Geralmente, e como é verificado nos compostos apresentados, os coeficientes de partição das formas neutras são maiores para os lipossomas do que para o octanol. Só para os compostos mais lipófilos com o  $\log D \geq 4$  é que a partição em octanol excede a partição lipossomal (Balon *et alii.*, 1999). Esse aumento do valor de  $\log D_{L/A}$  em relação ao  $\log D_{O/A}$  é em média somente 0,68 unidades superior, não sendo muito significativo, facto que não se verifica para os compostos carregados negativa ou positivamente, como será mostrado mais a frente.

Embora a relação entre os lipossomas e o octanol tenha sido verificada para fármacos neutros, o principal objectivo deste trabalho é saber qual dos dois modelos se adequa melhor como modelo biomembranar, de forma a prever a absorção dos fármacos.

Ambos os modelos apresentam uma absorção elevada para o conjunto de fármacos neutros apresentados. A correlação entre o  $F_a$  e os valores de  $\log D$  é satisfatória para os dois modelos. No caso dos lipossomas (Gráfico 2A), é no entanto possível observar um agrupamento de fármacos para os valores de  $\log D_{L/A}$  entre 2,21 e 3,58, indicando um intervalo óptimo de lipofilia para uma elevada absorção. No caso do octanol (Gráfico 2B), não se verifica tal intervalo, sendo todos os fármacos absorvidos satisfatoriamente ao longo do intervalo de  $\log D_{O/A}$ . Tanto para os lipossomas como para o octanol, as moléculas hidrófobas com elevados valores de  $\log D$  têm difusão



através das membranas favorecida e as moléculas hidrófilas com baixos valores de  $\log D$  possuem valores mais baixos de  $F_a$ , como já foi evidenciado em outros estudos (Hou *et alii.*, 2007). Considerando estes resultados, é possível concluir que ambos os modelos demonstram uma boa capacidade para prever a absorção de fármacos neutros. Um estudo envolvendo como parâmetro de absorção a ligação ao soro humano de albumina em vez do  $F_a$ , obteve também bons resultados, para o octanol como modelo de previsão de absorção para moléculas neutras (Valko *et alii.*, 2003).

Contrariamente ao que foi observado para os compostos neutros, o mesmo não se verifica para os compostos carregados negativa ou positivamente. Começando pelos compostos ácidos, é possível verificar a total falta de relação entre os valores de distribuição do octanol com os valores dos lipossomas (Gráfico 3). O gráfico mostra um conjunto de pontos espalhados sem qualquer tipo de tendência demonstrada e com um  $R^2 = 0,1487$ . Para o caso dos compostos carregados positivamente (Gráfico 5), também não se define nenhuma correlação que se assemelhe aos compostos neutros. Antes pelo contrário, apresenta um padrão semelhante ao verificado para os compostos carregados negativamente. O gráfico 5 não mostra uma tendência linear e apresenta um  $R^2 = 0,4672$ . Loidl-Stahlhofen e colaboradores (2001) também relataram o mesmo resultado para compostos carregados. Outros estudos (Balon *et alii.*, 1999; Rodrigues *et alii.*, 2001; Österberg *et alii.*, 2001) também reportaram uma fraca correlação para bases na forma catiónica, bem como para os ácidos na forma aniónica entre os dois sistemas. Com o resultado observado para os compostos ácidos e básicos, é possível concluir que o facto destes compostos se encontrarem ionizados implica que as interacções electrostáticas desempenham um papel crucial na partição em lipossomas (Fruttero *et alii.*, 1998).

Como já foi referido anteriormente, Balon e colaboradores (1999) verificaram que os coeficientes de partição das formas neutras são maiores para os lipossomas do que para o octanol, excepto para os compostos mais lipófilos com o  $\log D \geq 4$  é que a partição em octanol excede a partição lipossomal. De facto, tal foi verificado nos compostos neutros com um ligeiro aumento dos valores de distribuição nos lipossomas em relação ao octanol. No entanto, para o caso de compostos ionizados, quer carregados negativamente quer carregados positivamente, o mesmo se verifica, mas de forma mais clara. Enquanto que para os compostos neutros esse aumento é em média somente de 0,68 unidades, é de 1,91 para os compostos negativos e de 1,87 para os compostos

positivo. No seu trabalho, Balon e colaboradores (1999) obtiveram valores semelhantes. Isto demonstra o que já tinha sido relatado, em que as interações electrostáticas desempenham um papel importante na partição desses mesmos compostos, sendo que os compostos interagem mais fortemente com os lipossomas do que com o octanol no caso de estes estarem carregados.

A falta de correlação linear entre o  $\log D_{L/A}$  e o  $\log D_{O/A}$  para os compostos ácidos mostra a forte influência que a carga negativa tem entre os dois sistemas, resultado observado em diversos trabalhos (Balon *et alii.*, 1999; Rodrigues *et alii.*, 2001; Österberg *et alii.*, 2001). Tais resultados devem-se ao facto de fármacos, carregados negativamente, terem uma forte interação com as cabeças carregadas positivamente dos lipossomas, nomeadamente com o grupo colina do fosfolípido. O mesmo se sucede no caso dos compostos básicos, mas este deve-se ao facto dos compostos com carga positiva passarem mais tempo aprisionados na região hidrocarbonada do lipossoma devido a interações com o grupo fosfato adjacente (Österberg *et alii.*, 2001).

Uma vez demonstrada a falta de correlação entre o modelo lipossomal e o octanol para compostos carregados, é necessário observar qual o comportamento de cada um perante a absorção dos mesmos compostos. Para esta análise, certos fármacos não foram considerados devido a duas razões: *i)* ao baixo peso molecular; *ii)* fraca absorção verificada.

A antipirina, o ácido salicílico, o ácido acetilsalicílico, a rilmenidina e a nicotina não foram considerados para a correlação entre o  $\log D$  e o  $F_a$  (Gráficos 4 e 6), isto porque, fármacos com valores de  $PM < 200$  são geralmente absorvidos por transporte paracelular. Os compostos que usam esse tipo de transporte não são correctamente classificados através do  $F_a$  (Liu *et alii.*, 2002). A antipirina apresenta um  $PM$  de 180,2, o ácido salicílico possui um  $PM$  de 138,0, o ácido acetilsalicílico um  $PM$  de 180,2, a rilmenidina um  $PM$  de 180,0 (Remko *et alii.*, 2006) e a nicotina um  $PM$  de 162,0 (Zhu *et alii.*, 2002), preenchendo o requisito apresentado por Liu e colaboradores (2002) para que a sua absorção seja aumentada devido ao transporte paracelular.

Por sua vez, a sulfassalazina também não foi considerada na relação entre o  $\log D$  e o  $F_a$ , mas neste caso a razão é outra. A sulfassalazina tem um  $\log D_{L/A}$  de 3,16 e um  $F_a$  de 12 %, sendo considerada uma sulfonamida de pobre absorção em que grande

parte é excretada pela urina sem sofrer qualquer alteração. Com um coeficiente de distribuição tão elevado, seria de esperar uma absorção superior, tendo em conta os resultados observados neste trabalho. Tal facto não se verifica porque a sulfassalazina sofre uma biotransformação no cego e no cólon, originando a sulfapiridina. Esse mesmo metabolito é depois bem absorvido no cólon (Oprea e Gottfries, 1999). Pieniaszek e colaboradores desenvolveram um trabalho no qual a sulfapiridina apresenta uma biodisponibilidade de 92,7 %, quando administrada oralmente através de comprimidos revestidos (*cit. in* Oprea e Gottfries, 1999).

Após a remoção dos compostos acima mencionados para a análise da correlação entre os  $\log D$  com o  $F_a$ , é possível observar uma boa correlação do  $\log D_{L/A}$  com o  $F_a$  para os compostos carregados negativamente (Gráfico 4A). De facto, uma clara relação hiperbólica é apresentada ( $R^2 = 0,5787$ ), em que entre valores de  $\log D_{L/A}$  de 0,72 e 1,60 existe uma fase ascendente da curva e a partir de valores de  $\log D_{L/A}$  de 1,60 até 3,16 surge uma zona de absorção máxima, indicando um intervalo óptimo para a passagem dos compostos pelas membranas biológicas. A relação do  $F_a$  destes mesmos compostos com o octanol não apresenta uma tendência clara (Gráfico 4B). A curva apresenta um aumento gradual, mas sem capacidade de prever qual o melhor intervalo de  $\log D_{O/A}$  para a passagem dos compostos pelas biomembranas, tal como se verifica nos lipossomas, apresentando um baixo valor de  $R^2 = 0,1164$ . Embora apresente bons valores de absorção com  $\log D_{O/A}$  compreendidos entre -0,89 e 0,34 e entre 0,59 e 1,40, o modelo do octanol apresenta inconsistências como o caso da xipamida que para um  $\log D_{O/A}$  de 0,50 apresenta um  $F_a$  de 70 %. Esta ambiguidade de resultados para o octanol não permite prever de forma fiável a absorção de fármacos carregados negativamente. Tal implica que os lipossomas mimetizam realmente as propriedades das membranas biológicas devido a sua estrutura molecular ordenada capaz de exercer interações electrostáticas em relação ao sistema isotrópico do octanol/água (Rodrigues *et alii.*, 2001; Österberg *et alii.*, 2001).

Para os compostos carregados positivamente, é possível observar, no modelo lipossomal (Gráfico 6A), uma curva hiperbólica acentuada com três zonas distintas. A zona ascendente entre  $\log D_{L/A}$  de 1,00 e 1,29, a zona estacionária entre  $\log D_{L/A}$  de 1,29 e 3,39, correspondendo a zona de absorção máxima e por último a zona descendente entre  $\log D_{L/A}$  de 3,39 até 3,75. A parte descendente da curva deve-se à diminuição da absorção por causa do aprisionamento das moléculas, com elevada lipofilia, no interior

da bicamada. A curva apresenta um  $R^2$  igual a 0,5200, com um intervalo óptimo de absorção para os compostos carregados positivamente. No modelo do octanol (Gráfico 6B), tal não se verifica. Não é possível distinguir diferentes zonas na curva ( $R^2 = 0,2145$ ), pois no intervalo de valores de  $\log D_{O/A}$  apresentados é possível verificar a oscilação dos valores de absorção, impossibilitando a previsão da absorção de fármacos carregados positivamente. Num estudo recente, Flaten e colaboradores (2006) testaram a permeabilidade dos fármacos entre diferentes modelos entre os quais lipossomas, células CACO-2 (célula de adenocarcinoma de colo humano) e PAMPA (ensaio de permeabilidade em membranas artificiais paralelas) e também concluíram que os lipossomas são o melhor modelo de absorção *in vivo*. Por outro lado, o trabalho de Valko e colaboradores (2003) que relacionaram o  $\log D_{O/A}$  com o soro humano de albumina, anteriormente referenciado, não apresenta uma boa correlação entre estes dois parâmetros para solutos carregados, de igual forma ao que é apresentado neste trabalho.

Com os resultados obtidos em relação aos compostos carregados, quer negativa quer positivamente, é possível concluir a falta de capacidade total do modelo octanol/água em prever a absorção destes mesmos fármacos. Isto implica que a capacidade do octanol em estabelecer somente ligações hidrófobas e de hidrogénio é insuficiente para prever os mecanismos de absorção complexos que ocorrem nas membranas biológicas para compostos carregados, falhando na capacidade que os lipossomas têm em estabelecer interações electrostáticas (Carrozzino e Kahledi, 2004) através da sua cabeça polar hidrófila, nomeadamente o grupo fosfato carregado negativamente e o grupo colina carregado positivamente, e ligações hidrófobas e de hidrogénio através da sua cauda hidrocarbonada. O coeficiente de distribuição lipossomal de fármacos ionizáveis tem sido usado com sucesso para determinar o potencial de absorção, que se correlaciona com a percentagem de absorção intestinal em humanos, contrariamente ao octanol (Balon *et alii.*, 1999; Wang *et alii.*, 2007).

No caso da correlação entre o modelo lipossomal e o octanol dos compostos parcialmente ionizados, o resultado obtido foi de alguma forma inesperado pelo que já foi evidenciado anteriormente. O gráfico 7 mostra uma tendência linear com um  $R^2 = 0,9367$ , semelhante ao que foi observado com os compostos neutros. Este resultado não era esperado uma vez que estes compostos particionam através de ligações hidrófobas e de hidrogénio, mas também através de interações electrostáticas, interações estas que o octanol é incapaz de estabelecer. Os valores de  $\log D_{L/A}$  apresentam-se

ligeiramente acima dos valores de  $\log D_{O/A}$  com uma média de 0,71 unidades, tal como sucedeu nos compostos neutros, como já tinha sido referenciado por Balon e colaboradores (1999).

Em relação à comparação dos coeficientes de distribuição de ambos os modelos com os valores de absorção, o resultado já vai de encontro ao esperado. Quer no modelo lipossomal (Gráfico 8A), quer no modelo do octanol (Gráfico 8B), é possível observar uma curva hiperbólica que prevê a capacidade de absorção a diferentes valores de  $\log D$ . É, no entanto, possível observar uma melhoria do sistema lipossomal ( $R^2 = 0,4728$ ) em relação ao octanol ( $R^2 = 0,2075$ ). Esta variação entre os dois modelos não era tão acentuada para os compostos neutros, levando à conclusão que, na questão da partição, as interações electrostáticas juntamente com as ligações hidrófobas prevêem de forma mais exacta a absorção membranar para fármacos parcialmente carregados (Ishihama *et alii.*, 1996). Tal como sucedeu nos compostos positivos, a zona descendente da curva, deve-se a diminuição da absorção devido ao aprisionamento das moléculas, com elevada lipofilia, no interior da bicamada. Neste sentido, o modelo lipossomas adequa-se melhor na previsão da absorção deste tipo de composto. Porém, não é observado uma relação tão forte entre os valores de  $\log D_{L/A}$  com o  $F_a$  como foi no caso dos compostos completamente carregados, confirmando que quanto maior o grau de ionização de uma molécula maior o distúrbio da carga eléctrica na interacção lipófila (Barbato *et alii.*, 1997)

## **VII. Conclusões**

Neste trabalho, foram apresentados dois sistemas, nomeadamente o lipossoma/água e o octanol/água, como modelos biológicos para a previsão da absorção de fármacos em humanos. Os resultados obtidos neste trabalho foram de encontro ao esperado.

Os dois modelos correlacionam-se bem com os compostos neutros e parcialmente ionizados, mas o mesmo já não se verifica no caso de compostos totalmente carregados, em que não se observou nenhuma correlação favorável entre os dois modelos. Desta forma, quando se estuda os coeficientes de partição no sentido de os correlacionar com a absorção, é importante ter em conta a capacidade de ionização dos compostos, pois as diferentes formas, ionizadas ou não, apresentam diferentes partições entre o modelo lipossomal e o octanol.

Quanto a relação dos dois modelos com a absorção, concluiu-se que para moléculas neutras ambos os modelos são satisfatórios. O mesmo já não se sucede para compostos ionizados, em que a o sistema lipossomal é claramente superior ao octanol.

A diferença mais marcante entre os dois sistemas é a maior partição em lipossomas do que em octanol de moléculas ionizadas. Isto resulta, em primeiro lugar, do efeito das interacções entre moléculas ionizadas e os grupos funcionais iónicos dos lipossomas, resultando numa maior afinidade com membranas, até com compostos mais hidrófilos, do que seria estimado a partir da baixa partição em solventes orgânicos.

O valor dos ensaios de lipofilia é óbvio em diversos aspectos. Em primeiro lugar, a boa correlação entre os lipossomas e o octanol no que diz respeito as moléculas neutras, e em segundo lugar a melhor correlação entre os lipossomas e o  $F_a$  para moléculas ionizadas.

É notória a necessidade em obter uma ferramenta para a estimação de parâmetros biofarmacêuticos, como modelos de previsão da absorção, por parte da indústria farmacêutica, de forma a produzir fármacos com melhor actividade e menos efeitos secundários, minimizar os custos e tempo desde a descoberta da molécula com propriedades farmacológicas até a sua introdução no mercado e a redução da experimentação em animais.

O parâmetro de absorção ( $F_a$ ) usado neste trabalho demonstra ser eficaz na previsão da absorção dos fármacos que são absorvidos por difusão passiva (Liu *et alii.*, 2002). Assim sendo, o  $\log D_{L/A}$  pode ser usado para a previsão *in vitro* da  $F_a$  em humanos.

A base de dados apresentada neste trabalho poderá ser melhorada futuramente, procurando mais referências e introduzindo valores experimentais adicionais de qualidade. Considerando que a absorção de fármacos é um processo complexo, decorrente de processos fisiológicos múltiplos, deverão ser abordados modelos que tenham em conta tanto a difusão passiva como o transporte paracelular ou ainda o transporte activo.

### **VIII. Bibliografia**

- Alcorn, C. J., Simpson R. J., Leahy D. E. e Peters T. J. (1993). "Partition and distribution coefficients of solutes and drugs in brush border membrane vesicles." *Biochemical Pharmacology* 45(9): 1775-1782.
- An, S. Y., Bui M. P. N., Nam Y. J., Han K. N., Li C. A., Choo J., Lee E. K., Katoh S., Kumada Y. e Seong G. H. (2009). "Preparation of monodisperse and size-controlled poly(ethylene glycol) hydrogel nanoparticles using liposome templates." *Journal of Colloid and Interface Science* 331(1): 98-103.
- Attwood, D. e Florence A. T. (1983). *Surfactant Systems: Their Chemistry, Pharmacy and Biology*. London, Chapman and Hall.
- Avdeef, A., Box K. J., Comer J. E. A., Hibbert C. e Tam K. Y. (1998). "pH-Metric logP 10. Determination of Liposomal Membrane-Water Partition Coefficients of Ionizable Drugs." *Pharmaceutical Research* 15(2): 209-215.
- Baena, Y., Pinzón J., Barbosa H. e Martínez F. (2004). "Estudio termodinámico de la transferencia de acetaminofén desde el agua hasta el octanol." *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 40: 413-420.
- Baka, E., Comer J. E. A. e Takács-Novák K. (2008). "Study of equilibrium solubility measurement by saturation shake-flask method using hydrochlorothiazide as model compound." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 46(2): 335-341.
- Balon, K., Riebesehl B. U. e Müller B. W. (1999). "Drug Liposome Partitioning as a Tool for the Prediction of Human Passive Intestinal Absorption." *Pharmaceutical Research* 16(6): 882-888.
- Bangham, A. D., Standish M. M. e Watkins J. C. (1965). "Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids." *Journal of Molecular Biology* 13(1): 238-252.
- Barbato, F., di Martino G., Grumetto L. e La Rotonda M. I. (2004). "Prediction of drug-membrane interactions by IAM-HPLC: effects of different phospholipid stationary phases on the partition of bases." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 22(4): 261-269.
- Barbato, F., La Rotonda M. I. e Quaglia F. (1997). "Interactions of nonsteroidal antiinflammatory drugs with phospholipids: Comparison between octanol/buffer partition coefficients and chromatographic indexes on immobilized artificial membranes." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 86(2): 225-229.
- Barriocanal, L., Taylor K. M. G. e Buckton G. (2004). "A study of liposome formation using a solution (isoperibol) calorimeter." *International Journal of Pharmaceutics* 287(1-2): 113-121.
- Barzanti, C., Evans R., Fouquet J., Gouzin L., Howarth N. M., Kean G., Levet E., Wang D., Wayemberg E., Yeboah A. A. e Kraft A. (2007). "Potentiometric determination of



octanol-water and liposome-water partition coefficients (log P) of ionizable organic compounds." *Tetrahedron Letters* 48(19): 3337-3341.

Beigi, F., Gottschalk I., Lagerquist Häggglund C., Haneskog L., Brekkan E., Zhang Y., Österberg T. e Lundahl P. (1998). "Immobilized liposome and biomembrane partitioning chromatography of drugs for prediction of drug transport." *International Journal of Pharmaceutics* 164(1-2): 129-137.

Berger, N., Sachse A., Bender J., Schubert R. e Brandl M. (2001). "Filter extrusion of liposomes using different devices: comparison of liposome size, encapsulation efficiency, and process characteristics." *International Journal of Pharmaceutics* 223(1-2): 55-68.

Block J. H., Beale J. M., Wilson C. O. e Gisvold O. (2004). *Wilson & Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins.

Boija, E. e Johansson G. (2006). "Interactions between model membranes and lignin-related compounds studied by immobilized liposome chromatography." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1758(5): 620-626.

Braekevelt, E., Tittlemier S. A. e Tomy G. T. (2003). "Direct measurement of octanol-water partition coefficients of some environmentally relevant brominated diphenyl ether congeners." *Chemosphere* 51(7): 563-567.

Brasili, L., Pignini M., Marucci G., Quaglia W., Malmusi L., Lanier S. M. e Lanier B. (1995). "Separation of alpha-adrenergic and imidazoline/guanidinium receptive sites (IGRS) activity in a series of imidazoline analogues of cirazoline." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 3(11): 1503-1509.

Brooke, D. N., Dobbs A. J. e Williams N. (1986). "Octanol: Water partition coefficients (P): Measurement, estimation, and interpretation, particularly for chemicals with P > 10 (5)." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 11(3): 251-260.

Burns, S. T. e Khaledi M. G. (2002). "Rapid determination of liposome-water partition coefficients (K<sub>lw</sub>) using liposome electrokinetic chromatography (LEKC)." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 91(7): 1601-1612.

Carlsson, K. e Karlberg B. (2000). "Determination of octanol-water partition coefficients using a micro-volume liquid-liquid flow extraction system." *Analytica Chimica Acta* 423(1): 137-144.

Caron, G., Reymond F., Carrupt P. A., Girault H. H. e Testa B. (1999). "Combined molecular lipophilicity descriptors and their role in understanding intramolecular effects." *Pharmaceutical Science & Technology Today* 2(8): 327-335.

Carrozzino, J. M. (2004). Drug Partitioning and Solvation Environments in Lipid Bilayers. Chemistry. Raleigh, NC, Faculty of North Carolina State University. Doctor: 245.

- Carrozzino, J. M. e Khaledi M. G. (2004). "Interaction of Basic Drugs with Lipid Bilayers Using Liposome Electrokinetic Chromatography." *Pharmaceutical Research* 21(12): 2327-2335.
- Castro, B., Gameiro P., Lima J. L. F. C., Matos C. e Reis S. (2001). "Location and partition coefficients of anti-inflammatory drugs in EPC liposomes. A fluorescence quenching study using n-(9-anthroyloxy)-stearic probes." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 190(1-2): 205-212.
- Choi, Y. W. e Rogers J. A. (1990). "The Liposome as a Model Membrane in Correlations of Partitioning with  $\alpha$ -Adrenoceptor Agonist Activities." *Pharmaceutical Research* 7(5): 508-512.
- Chorilli, M., Rimério T. C., Gomes de Oliveira A. e Scarpa M. V. (2007). "Obtenção e Caracterização de Lipossomas Unilamelares Pequenos Contendo Cafeína." *Latin American Journal of Pharmacy* 26(5): 715-722.
- Clarke, F. H. e Cahoon N. M. (1996). "Partition coefficients by curve fitting: The use of two different octanol volumes in a dual-phase potentiometric titration." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 85(2): 178-183.
- Copland, M. J., Rades T. e Davies N. M. (2000). "Hydration of lipid films with an aqueous solution of Quil A: a simple method for the preparation of immune-stimulating complexes." *International Journal of Pharmaceutics* 196(2): 135-139.
- Danielsson, L. G. e Zhang Y. H. (1996). "Methods for determining n-octanol-water partition constants." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 15(4): 188-196.
- De Young, L. R. e Dill K. A. (1988). "Solute partitioning into lipid bilayer membranes." *Biochemistry* 27(14): 5281-5289.
- Dearden, J. C. (1985). "Partitioning and lipophilicity in quantitative structure activity relationships." *Environmental Health Perspectives* 61: 203-228.
- Degim, T., Zaimoglu V., Akay C. e Degim Z. (2001). "pH-Metric log K calculations of famotidine, naproxen, nizatidine, ranitidine and salicylic acid." *Il Farmaco* 56(9): 659-663.
- Demana, P. H., Davies N. M., Berger B. e Rades T. (2004). "Incorporation of ovalbumin into ISCOMs and related colloidal particles prepared by the lipid film hydration method." *International Journal of Pharmaceutics* 278(2): 263-274.
- Dipali, S. R., Kulkarni S. B. e Betageri G. V. (1996). "Comparative Study of Separation of Non-encapsulated Drug from Unilamellar Liposomes by Various Methods." *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 48(11): 1112-1115.
- Dohányosová, P., Dohnal V. e Fenclová D. (2003). "Temperature dependence of aqueous solubility of anthracenes: accurate determination by a new generator column apparatus." *Fluid Phase Equilibria* 214(2): 151-167.
- Domińska, M. e Blanchard G. J. (2009). "Constituent-Dependent Liposome Structure and Organization." *Langmuir* 26(2): 1043-1050.

- El-Sayed, A. A. Y. e El-Salem N. A. (2005). "Recent Developments of Derivative Spectrophotometry and Their Analytical Applications." *Analytical Sciences* 21(6): 595-614.
- Ferreira, H., Lúcio M., Siquet C. e Reis S. (2005). Utilização de modelos membranares na avaliação da actividade de fármacos. *Química 099*. Porto, Departamento de Química-Física da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto: 13.
- Ferreira, M. M. C. (2001). "Polycyclic aromatic hydrocarbons: a QSPR study." *Chemosphere* 44(2): 125-146.
- Fisk, A. T., Rosenberg B., Cymbalisty C. D., Stern G. A. e Muir D. C. G. (1999). "Octanol/water partition coefficients of toxaphene congeners determined by the "slow-stirring" method." *Chemosphere* 39(14): 2549-2562.
- Flaten, G. E., Dhanikula A. B., Luthman K. e Brandl M. (2006). "Drug permeability across a phospholipid vesicle based barrier: A novel approach for studying passive diffusion." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 27(1): 80-90.
- Foucault, A. P. (2001). "Enantioseparations in counter-current chromatography and centrifugal partition chromatography." *Journal of Chromatography A* 906(1-2): 365-378.
- Frézard, F., Schettini D. A., Rocha O. G. F. e Demicheli C. (2005). "Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia á base de antimônio." *Química Nova* 28: 511-518.
- Frick, A., Möller H. e Wirbitzki E. (1998). "Biopharmaceutical characterization of oral immediate release drug products. In vitro/in vivo comparison of phenoxymethylpenicillin potassium, glimepiride and levofloxacin." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 46(3): 305-311.
- Fruttero, R. (2007). NMR Spectroscopy for the Study of Drug-Phospholipid Interactions. *Pharmacokinetic Optimization in Drug Research, Verlag Helvetica Chimica Acta*: 465-482.
- Fruttero, R., Caron G., Fornatto E., Boschi D., Ermondi G., Gasco A., Carrupt P. A. e Testa B. (1998). "Mechanisms of Liposomes/Water Partitioning of (p-Methylbenzyl)alkylamines." *Pharmaceutical Research* 15(9): 1407-1413.
- Ghosh, U., Weber A. S., Jensen J. N. e Smith J. R. (1998). "Dissolved PCB congener distribution in generator column solutions." *Water Research* 32(5): 1373-1382.
- Giaginis, C. e Tsantili-Kakoulidou A. (2008). "Alternative measures of lipophilicity: From octanol–water partitioning to IAM retention." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 97(8): 2984-3004.
- Gombar, V. K. e Enslein K. (1996). "Assessment of n-Octanol/Water Partition Coefficient: When Is the Assessment Reliable?" *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* 36(6): 1127-1134.

Gürsoy, A., Kut E. e Özkırımlı S. (2004). "Co-encapsulation of isoniazid and rifampicin in liposomes and characterization of liposomes by derivative spectroscopy." *International Journal of Pharmaceutics* 271(1-2): 115-123.

Hansch, C. e Fujita T. (1964). " $\rho$ - $\sigma$ - $\pi$  Analysis. A Method for the Correlation of Biological Activity and Chemical Structure." *Journal of the American Chemical Society* 86(8): 1616-1626.

Hartmann, T. e Schmitt J. (2004). "Lipophilicity - beyond octanol/water: a short comparison of modern technologies." *Drug Discovery Today: Technologies* 1(4): 431-439.

Hauser, H., Pascher I., Pearson R. H. e Sundell S. (1981). "Preferred conformation and molecular packing of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine." *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes* 650(1): 21-51.

Hirota, M., Totsu T., Adachi F., Kamikawa K., Watanabe J., Kanegasaki S. e Nakata K. (2001). "Comparison of antimycobacterial activity of grepafloxacin against *Mycobacterium avium* with that of levofloxacin: accumulation of grepafloxacin in human macrophages." *Journal of Infection and Chemotherapy* 7(1): 16-21.

Hong, H., Wang L. e Zou G. (1997). "Retention in RP-HPLC: Lipophilicity Determination of Substituted Biphenyls by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography." *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 20(18): 3029 - 3037.

Hou, T., Wang J., Zhang W. e Xu X. (2007). "ADME Evaluation in Drug Discovery. 7. Prediction of Oral Absorption by Correlation and Classification." *Journal of Chemical Information and Modeling* 47(1): 208-218.

Hou, T. J., Zhang W., Xia K., Qiao X. B. e Xu X. J. (2004). "ADME Evaluation in Drug Discovery. 5. Correlation of Caco-2 Permeation with Simple Molecular Properties." *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* 44(5): 1585-1600.

Ikonen, M., Murtomäki L. e Kontturi K. (2007). "An electrochemical method for the determination of liposome-water partition coefficients of drugs." *Journal of Electroanalytical Chemistry* 602(2): 189-194.

Ishihama, Y., Oda Y. e Asakawa N. (1996). "Hydrophobicity of Cationic Solutes Measured by Electrokinetic Chromatography with Cationic Microemulsions." *Analytical Chemistry* 68(23): 4281-4284.

Jones, M. N. e Chapman D. (1995). *Micelles, monolayers, and biomembranes*. New York, Willey.

Kah, M. e Brown C. D. (2008). "Log D: Lipophilicity for ionisable compounds." *Chemosphere* 72(10): 1401-1408.

Katz, Y. e Diamond J. M. (1974). "Thermodynamic constants for nonelectrolyte partition between dimyristoyl lecithin and water." *Journal of Membrane Biology* 17(1): 101-120.

- Kim, S. H., Haimovich-Caspi L., Omer L., Talmon Y. e Franses E. I. (2007). "Effect of sonication and freezing-thawing on the aggregate size and dynamic surface tension of aqueous DPPC dispersions." *Journal of Colloid and Interface Science* 311(1): 217-227.
- Kitamura, K., Imayoshi N., Goto T., Shiro H., Mano T. e Nakai Y. (1995). "Second derivative spectrophotometric determination of partition coefficients of chlorpromazine and promazine between lecithin bilayer vesicles and water." *Analytica Chimica Acta* 304(1): 101-106.
- Klopman, G. e Zhu H. (2005). "Recent methodologies for the estimation of N-octanol/water partition coefficients and their use in the prediction of membrane transport properties of drugs." *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 5(2): 127-133.
- Kong, X. Q., Shea D., Baynes R. E., Riviere J. E. e Xia X. R. (2007). "Regression method of the hydrophobicity ruler approach for determining octanol/water partition coefficients of very hydrophobic compounds." *Chemosphere* 66(6): 1086-1093.
- Kotecha, J., Shah S., Rathod I. e Subbaiah G. (2008). "Prediction of oral absorption in humans by experimental immobilized artificial membrane chromatography indices and physicochemical descriptors." *International Journal of Pharmaceutics* 360(1-2): 96-106.
- Krämer, S. D., Braun A., Jakits-Deiser C. e Wunderli-Allenspach H. (1998). "Towards the Predictability of Drug-Lipid Membrane Interactions: The pH-Dependent Affinity of Propranolol to Phosphatidylinositol Containing Liposomes." *Pharmaceutical Research* 15(5): 739-744.
- Krämer, S. D., Gautier J. C. e Saudemon P. (1998). "Considerations on the Potentiometric Log P Determination." *Pharmaceutical Research* 15(8): 1310-1313.
- Krämer, S. D., Jakits-Deiser C. e Wunderli-Allenspach H. (1997). "Free Fatty Acids Cause pH-Dependent Changes in Drug-Lipid Membrane Interactions Around Physiological pH." *Pharmaceutical Research* 14(6): 827-832.
- Krämer, S. D. e Wunderli-Allenspach H. (1996). "The pH-Dependence in the Partitioning Behaviour of (RS)-[<sup>3</sup>H]Propranolol Between MDCK Cell Lipid Vesicles and Buffer." *Pharmaceutical Research* 13(12): 1851-1855.
- Lasic, D. D. (1988). "The mechanism of vesicle formation." *Biochem. J.* 256: 11.
- Lasic, D. D. (1996). Liposomes. *Science and Medicine*: 10.
- Lasic, D. D. (1998). "Novel applications of liposomes." *Trends in Biotechnology* 16(7): 307-321.
- Leo, A., Hansch C. e Elkins D. (1971). "Partition coefficients and their uses." *Chemical Reviews* 71(6): 525-616.
- Leo, A. J. e Hansch C. (1971). "Linear free energy relations between partitioning solvent systems." *The Journal of Organic Chemistry* 36(11): 1539-1544.

- Liu, X. Y., Nakamura C., Yang Q., Kamo N. e Miyake J. (2002). "Immobilized liposome chromatography to study drug-membrane interactions: Correlation with drug absorption in humans." *Journal of Chromatography A* 961(1): 113-118.
- Liu, X. Y., Yang Q., Hara M., Nakamura C. e Miyake J. (2001). "A novel chromatographic solid support with immobilized unilamellar liposomes for model analysis of solute-membrane interaction: comparison with analysis using immobilized artificial membranes and free liposomal membranes." *Materials Science and Engineering: C* 17(1-2): 119-126.
- Loidl-Stahlhofen, A., Hartmann T., Schöttner M., Röhring C., Brodowsky H., Schmitt J. e Keldenich J. (2001). "Multilamellar Liposomes and Solid-Supported Lipid Membranes (TRANSIL): Screening of Lipid-Water Partitioning Toward a High-Throughput Scale." *Pharmaceutical Research* 18(12): 1782-1788.
- Loidl-Stahlhofen, A., Schmitt J., Noller J., Hartmann T., Brodowsky H., Schmitt W. e Keldenich J. (2001). "Solid-supported biomolecules on modified silica surfaces - A tool for fast physicochemical characterization and high-throughput screening." *Advanced Materials* 13(23): 1829-1834.
- Loidl-Stahlhofen, A., Ulrich A. S., Kaufmann S. e Bayerl T. M. (1996). "Protein binding to supported lecithin bilayers controlled by the lipid phase state: a new concept for highly selective protein purification." *European Biophysics Journal* 25(2): 151-153.
- Lombardi, D., Cuenoud B. e Krämer S. D. (2009). "Lipid membrane interactions of indacaterol and salmeterol: Do they influence their pharmacological properties?" *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 38(5): 533-547.
- Lundahl, P. e Beigi F. (1997). "Immobilized liposome chromatography of drugs for model analysis of drug-membrane interactions." *Advanced Drug Delivery Reviews* 23(1-3): 221-227.
- Lundqvist, A. e Lundahl P. (1997). "Chromatography on cells and biomolecular assemblies." *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 699(1-2): 209-220.
- Luo, Z., Murray B. S., Yusoff A., Morgan M. R. A., Povey M. J. W. e Day A. J. (2011). "Particle-Stabilizing Effects of Flavonoids at the Oil-Water Interface." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(6): 2636-2645.
- Malheiros, S. V. P., Pinto L. M. A., Gottardo L., Yokaichiya D. K., Fraceto L. F., Meirelles N. C. e Paula E. (2004). "A new look at the hemolytic effect of local anesthetics, considering their real membrane/water partitioning at pH 7.4." *Biophysical Chemistry* 110(3): 213-221.
- Mansilha, C. I. G. R. (2002). Estudo de partição e localização de fármacos em lipossomas por técnicas espectroscópicas. Departamento de Química. Porto, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Doutorado: 257.
- Marcelino, J., Lima J. L. F. C., Reis S. e Matos C. (2007). "Assessing the effects of surfactants on the physical properties of liposome membranes." *Chemistry and Physics of Lipids* 146(2): 94-103.

- Mason, R. P., Campbell S. F., Wang S. D. e Herbette L. G. (1989). "Comparison of location and binding for the positively charged 1,4-dihydropyridine calcium channel antagonist amlodipine with uncharged drugs of this class in cardiac membranes." *Molecular Pharmacology* 36(4): 634-640.
- Mei, J., Xu J. R., Xiao Y. X., Zhang Q. R. e Feng Y. Q. (2008). "Immobilized phospholipid capillary electrophoresis for study of drug-membrane interactions and prediction of drug activity." *Talanta* 75(1): 104-110.
- Melo, A. E. F. S. (2007). Partição e interações intermoleculares de flavonóides glicosilados com sistemas de imitação de membrana. Departamento de Química e Bioquímica. Lisboa, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Licenciatura: 58.
- Milhaud, J. (2004). "New insights into water-phospholipid model membrane interactions." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1663(1-2): 19-51.
- Molero-Monfort, M., Escuder-Gilabert L., Villanueva-Camañas R. M., Sagrado S. e Medina-Hernández M. J. (2001). "Biopartitioning micellar chromatography: an in vitro technique for predicting human drug absorption." *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 753(2): 225-236.
- Mukherjee, A., Hale V., Borga O. e Stein R. (1996). "Predictability of the clinical potency of NSAIDs from the preclinical pharmacodynamics in rats." *Inflammation Research* 45(11): 531-540.
- Nasal, A., D. Siluk e Kaliszan. R. (2003). "Chromatographic Retention Parameters in Medicinal Chemistry and Molecular Pharmacology." *Current Medicinal Chemistry* 10: 381-426.
- Nelson, D. L. e Cox M. M. (2002). *Lehninger Principles of Biochemistry*. New York, Worth Publishers, Inc.
- Ong, S., Liu H. e Pidgeon C. (1996). "Immobilized-artificial-membrane chromatography: measurements of membrane partition coefficient and predicting drug membrane permeability." *Journal of Chromatography A* 728(1-2): 113-128.
- Oprea, T. I. e Gottfries J. (1999). "Toward minimalistic modeling of oral drug absorption." *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 17(5-6): 261-274.
- Österberg, T., Svensson M. e Lundahl P. (2001). "Chromatographic retention of drug molecules on immobilised liposomes prepared from egg phospholipids and from chemically pure phospholipids." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 12(4): 427-439.
- Panchagnula, R. e Thomas N. S. (2000). "Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research." *International Journal of Pharmaceutics* 201(2): 131-150.
- Paschke, A., Manz M. e Schüürmann G. (2001). "Application of different RP-HPLC methods for the determination of the octanol/water partition coefficient of selected tetrachlorobenzyltoluenes." *Chemosphere* 45(6-7): 721-728.

- Pereira-Lachataignerais, J., Pons R., Panizza P., Courbin L., Rouch J. e López O. (2006). "Study and formation of vesicle systems with low polydispersity index by ultrasound method." *Chemistry and Physics of Lipids* 140(1-2): 88-97.
- Pérez, M. A. C., Sanz M. B., Torres L. R., Ávalos R. G., González M. P. e Díaz H. G. (2004). "A topological sub-structural approach for predicting human intestinal absorption of drugs." *European Journal of Medicinal Chemistry* 39(11): 905-916.
- Pidgeon, C. e Venkataram U. V. (1989). "Immobilized artificial membrane chromatography: Supports composed of membrane lipids." *Analytical Biochemistry* 176(1): 36-47.
- Poole, S. K. e Poole C. F. (2003). "Separation methods for estimating octanol-water partition coefficients." *Journal of Chromatography B* 797(1-2): 3-19.
- Pramauro, E. e Pelezetti E. (1996). *Surfactants in analytical chemistry: Applications of organized amphiphilic media*. Amsterdam, Elsevier.
- Remko, M., Swart M. e Bickelhaupt F. M. (2006). "Theoretical study of structure, pKa, lipophilicity, solubility, absorption, and polar surface area of some centrally acting antihypertensives." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14(6): 1715-1728.
- Rodrigues, C., Gameiro P., Reis S., Lima J. L. F. C. e Castro B. (2001). "Derivative spectrophotometry as a tool for the determination of drug partition coefficients in water/dimyristoyl-L- $\alpha$ -phosphatidylglycerol (DMPG) liposomes." *Biophysical Chemistry* 94(1-2): 97-106.
- Rogachev, I., Serra C., Farran A., Cortina J. L., Gressel J. e Warshawsky A. (2003). "Prediction of the octanol-water distribution of dithiocarbamate derivatives." *Reactive and Functional Polymers* 54(1-3): 17-24.
- Rogers, J. A. e Choi Y. W. (1993). "The Liposome Partitioning System for Correlating Biological Activities of Imidazolidine Derivatives." *Pharmaceutical Research* 10(6): 913-917.
- Sanghvi, T., Ni N., Mayersohn M. e Yalkowsky S. H. (2003). "Predicting passive intestinal absorption using a single parameter." *Qsar & Combinatorial Science* 22(2): 247-257.
- Sangster, J. (1989). "Octanol-water partition coefficients of simple organic compounds." *Journal of Physical and Chemical Reference Data* 18(3): 1111-1229.
- Saunders, R. A. e Platts J. A. (2004). "Scaled polar surface area descriptors: development and application to three sets of partition coefficients." *New Journal of Chemistry* 28(1): 166-172.
- Seelig, J., MacDonald P. M. e Scherer P. G. (1987). "Phospholipid head groups as sensors of electric charge in membranes." *Biochemistry* 26(24): 7535-7541.
- Sethi, B., Soni M., Kumar S., Gupta G. D., Mishra S. e Singh R. (2010). "Lipophilicity Measurement Through Newer Techniques." *Journal of Pharmacy Research* 3(2): 345 - 351.



- Shalaeva, M., Kenseth J., Lombardo F. e Bastin A. (2008). "Measurement of dissociation constants (pKa values) of organic compounds by multiplexed capillary electrophoresis using aqueous and cosolvent buffers." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 97(7): 2581-2606.
- Sharma, A. e Sharma U. S. (1997). "Liposomes in drug delivery: Progress and limitations." *International Journal of Pharmaceutics* 154(2): 123-140.
- Shore, P. A., Brodie B. B. e Hogben C. A. M. (1957). "The gastric secretion of drugs: A pH partition hypothesis." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 119(3): 361-369.
- Short, J., Roberts J., Roberts D. W., Hodges G., Gutsell S. e Ward R. S. (2010). "Practical methods for the measurement of log P for surfactants." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73(6): 1484-1489.
- Silva, L. R. e Ferreira M. M. C. (2003). "Estudo do coeficiente de partição octanol-água de bifenilas policloradas (PCBs) utilizando parâmetros topológicos." *Química Nova* 26: 312-318.
- Smith, D. A., van de Waterbeemd H. e Walker D. K. (2006). *Pharmacokinetics and Metabolism in Drug Design*. Weinheim, Wiley-VCH.
- Sułkowski, W. W., Pentak D., Nowak K. e Sułkowska A. (2005). "The influence of temperature, cholesterol content and pH on liposome stability." *Journal of Molecular Structure*: 737-747.
- Taillardat-Bertschinger, A., Martinet C. A. M., Carrupt P.-A., Reist M., Caron G., Fruttero R. e Testa B. (2002). "Molecular Factors Influencing Retention on Immobilized Artificial Membranes (IAM) Compared to Partitioning in Liposomes and Octanol." *Pharmaceutical Research* 19(6): 729-737.
- Torres, I. M. S. (2008). Cefotaxima e cefepima encapsuladas em lipossomas unilamelares: obtenção, caracterização e avaliação da actividade antimicrobiana *in vitro* contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Brasília, Universidade de Brasília. Doutarmento: 123.
- Valko, K., Nunhuck S., Bevan C., Abraham M. H. e Reynolds D. P. (2003). "Fast gradient HPLC method to determine compounds binding to human serum albumin. Relationships with octanol/water and immobilized artificial membrane lipophilicity." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 92(11): 2236-2248.
- van Balen, G. P., Martinet C. a. M., Caron G., Bouchard G., Reist M., Carrupt P. A., Fruttero R., Gasco A. e Testa B. (2004). "Liposome/water lipophilicity: Methods, information content, and pharmaceutical applications." *Medicinal Research Reviews* 24(3): 299-324.
- Vergères, G., Manenti S., Weber T. e Stürzinger C. (1995). "The Myristoyl Moiety of Myristoylated Alanine-rich C Kinase Substrate (MARCKS) and MARCKS-related Protein is Embedded in the Membrane." *Journal of Biological Chemistry* 270(34): 19879-19887.

- Vieira, M., Barboza M. e Giordano R. (2003). "Adsorption of components of enzymatic synthesis of ampicillin on different hydrophobic resins." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 108(1): 705-713.
- Vrakas, D., Giaginis C. e Tsantili-Kakoulidou A. (2008). "Electrostatic interactions and ionization effect in immobilized artificial membrane retention A comparative study with octanol-water partitioning." *Journal of Chromatography A* 1187(1-2): 67-78.
- Wan, H., Holmén A. G., Wang Y., Lindberg W., Englund M., Någård M. B. e Thompson R. A. (2003). "High-throughput screening of pKa values of pharmaceuticals by pressure-assisted capillary electrophoresis and mass spectrometry." *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 17(23): 2639-2648.
- Wang, Y., Sun J., Liu H., Wang Y. e He Z. (2007). "Prediction of Human Drug Absorption Using Liposome Electrokinetic Chromatography." *Chromatographia* 65(3): 173-177.
- Werdehausen, R., Fazeli S., Braun S., Hermanns H., Essmann F., Hollmann M. W., Bauer I. e Stevens M. F. (2009). "Apoptosis induction by different local anaesthetics in a neuroblastoma cell line." *British Journal of Anaesthesia* 103(5): 711-718.
- Wiedmer, S. K., Kulovesi P. e Riekkola M. L. (2008). "Liposome electrokinetic capillary chromatography in the study of analyte-phospholipid membrane interactions. Application to pesticides and related compounds." *Journal of Separation Science* 31(14): 2714-2721.
- Wimley, W. C. e White S. H. (1993). "Quantitation of Electrostatic and Hydrophobic Membrane Interactions by Equilibrium Dialysis and Reverse-Phase HPLC." *Analytical Biochemistry* 213(2): 213-217.
- Yang, Q., Liu X. Y., Ajiki S. i., Hara M., Lundahl P. e Miyake J. (1998). "Avidin-biotin immobilization of unilamellar liposomes in gel beads for chromatographic analysis of drug-membrane partitioning." *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 707(1-2): 131-141.
- Yang, Q., Liu X. Y., Umetani K., Kamo N. e Miyake J. (1999). "Partitioning of triphenylalkylphosphonium homologues in gel bead-immobilized liposomes: chromatographic measurement of their membrane partition coefficients." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1417(1): 122-130.
- Yang, Q., Liu X. Y., Yoshimoto M., Kuboi R. e Miyake J. (1999). "Covalent Immobilization of Unilamellar Liposomes in Gel Beads for Chromatography." *Analytical Biochemistry* 268(2): 354-362.
- Yoshida, F. e Topliss J. G. (2000). "QSAR Model for Drug Human Oral Bioavailability<sup>1</sup>." *Journal of Medicinal Chemistry* 43(13): 2575-2585.
- Yoshimoto, N., Yoshimoto M., Yasuhara K., Shimanouchi T., Umakoshi H. e Kuboi R. (2006). "Evaluation of temperature and guanidine hydrochloride-induced protein-liposome interactions by using immobilized liposome chromatography." *Biochemical Engineering Journal* 29(3): 174-181.

Zhang, Y., Zhang R., Hjertén S. e Lundahl P. (1995). "Liposome capillary electrophoresis for analysis of interactions between lipid bilayers and solutes." *Electrophoresis* 16(1): 1519-1523.

Zhu, C., Jiang L., Chen T. M. e Hwang K. K. (2002). "A comparative study of artificial membrane permeability assay for high throughput profiling of drug absorption potential." *European Journal of Medicinal Chemistry* 37(5): 399-407.