

CARACTERIZAÇÃO DE MODELOS BIOMEMBRANARES (MICELAS E LIPOSSOMAS) PARA A DETERMINAÇÃO DE COEFICIENTES DE PARTIÇÃO.

Carla Matos - *Faculdade de Ciências da Saúde, UFP*
Professora Auxiliar | cmatos@ufp.pt

Carla Moutinho - *Faculdade de Ciências da Saúde, UFP*
Professora Auxiliar | carlamo@ufp.pt

Cristina V. Almeida - *Faculdade de Ciências da Saúde, UFP*
Professora Auxiliar | calmeida@ufp.pt

Victor Balcão - *Faculdade de Ciências da Saúde, UFP*
Professor Auxiliar | vbacao@ufp.pt

■ ABSTRACT

A drug's mechanism of action is dependent and related to its chemical structure and, in the bottom line, to the ability of the structure to interact with biological systems. The phospholipid composed cell membrane is a particularly important system for the pharmacological action of a drug, hence pharmacokinetic parameters are generally related with the drug/membrane interaction. This interaction is dependent on the hydrophilic/lipophilic balance of the drug, a parameter traditionally assessed by the organic solvent/water partition coefficient. Liposomes and micelles, due to their composition and physical organization, can constitute basic structural models for the cell membrane, being a precious tool in drug/membrane interaction studies. The use of these simpler models allows for the comprehension of basic processes, from which a progressive complexity can be added to the system, for a progressive insight of the involved phenomena. In this context, the determination of the liposome/water, or micelle/water partition coefficients, can constitute an indicative parameter of the drug's real behaviour in the biological system.

■ RESUMO

O mecanismo de acção de um fármaco está intimamente dependente e relacionado com a sua estrutura química e, em última análise, com a capacidade que essa estrutura lhe confere de interagir com sistemas biológicos. A membrana celular, de composição fosfolipídica, é um sistema de particular importância no contexto da acção farmacológica, uma vez que os parâmetros farmacocinéticos estão, de uma forma geral, dependentes da capacidade de interacção de um fármaco com esta estrutura. Essa capacidade está dependente do equilíbrio hidrófilo/lipófilo da molécula, parâmetro tradicionalmente relacionado com o coeficiente de partição solvente orgânico/ água. Os lipossomas e as micelas, devido à sua composição e organização, constituem modelos estruturais básicos das membranas celulares, sendo um instrumento precioso em estudos de interacção de fármacos com membranas. A utilização destes modelos mais simples permite a compreensão de processos básicos, a partir da qual se pode aumentar o grau de complexidade do sistema, numa percepção progressiva dos fenómenos envolvidos. Neste contexto, a determinação do coeficiente de partição lipossoma/água, ou micela/água, constituirá um parâmetro indicativo do comportamento real do fármaco no sistema biológico.

80 I. INTRODUÇÃO

A grande complexidade e a biodiversidade dos organismos vivos dificultam o seu estudo pormenorizado e sua compreensão acessível. Qualquer determinação efectuada *in vivo* envolve um número elevado de experiências que estude todas as variáveis do sistema, de forma a tornar o ensaio estatisticamente aceitável. Por esta razão, acarretam uma morosidade própria, que desde sempre se procurou diminuir e contornar.

Vários foram os trabalhos anteriormente efectuados que procuraram apontar as correlações entre a actividade biológica e as características físico-químicas de variadas substâncias (Korolkovas e Burckhalter, 1988; Santos, 1994; Lopes, 1997). Numa tentativa de entender a relação estrutura/propriedades químicas/actividade farmacológica de um fármaco, têm sido utilizados diversos modelos e equações matemáticas que incluem parâmetros que traduzem as características físico-químicas desses compostos (Korolkovas e Burkhalter, 1988). Diferentes parâmetros têm sido utilizados, aparecendo, desta forma, o conceito de “previsores físico-químicos”, os quais podem ser sistematizados em quatro grandes grupos: os parâmetros de solubilidade, os electrónicos empíricos, os electrónicos semi-empíricos e os parâmetros estereoquímicos. Também chamados de parâmetros hidrofóbicos ou lipofílicos, os parâmetros de solubilidade medem o grau de interacção entre os fármacos e as regiões hidrofóbicas das macromoléculas. Estes estão relacionadas, por um lado, com o transporte dos fármacos desde o seu local de administração até ao seu local de acção e, por outro lado, com a possibilidade de atracção e de interacção entre as regiões hidrofóbicas das substâncias e dos receptores. Os principais “indicadores” são a solubilidade, os coeficientes de partição, a constante de hidrofobicidade, os parâmetros cromatográficos, a tensão superficial, a polarizabilidade e a densidade electrónicas.

Os parâmetros electrónicos empíricos são constantes que quantificam o efeito electrónico de um substituinte na variação de energia livre, ΔG° , de uma reacção química e/ou de uma interacção fármaco/receptor. As mais utilizadas são as constantes do substituinte σ de Hammett, constantes de derivadas de σ e as constantes de acidez. Devido à natureza parcialmente lipídica das membranas celulares, a passagem dos fármacos através delas é facilitada àqueles compostos que apresentam uma lipossolubilidade alta. Esta é, por sua vez, influenciada pelas propriedades ácido/base dos fármacos e pelo seu grau de ionização.

Os parâmetros electrónicos semi-empíricos relacionam-se com os electrões π , as energias correspondentes e vários outros índices electrónicos, visto que os electrões π , por serem deslocalizados, condicionam a maioria das propriedades físico-químicas das moléculas. Os principais parâmetros traduzem o carácter dador ou aceitador de electrões, as energias de transferências de carga, de deslocalização ou de ressonância e ainda o potencial de ionização.

Finalmente, os parâmetros estereoquímicos medem o efeito estereoquímico intramolecular, tentando traduzir a contribuição da geometria e do tamanho

de um substituinte introduzido na molécula de um dado composto. Alguns dos parâmetros estereoquímicos mais utilizados são os seguintes: constantes estérica, raios de van der Waals e constantes de substituinte de Taft. Estes parâmetros são bastante importantes, na medida que muitas das interacções entre os fármacos e os seus receptores são estereoespecíficas.

A avaliação da actividade biológica de um fármaco a partir de simples “previsores físico-químicos” torna-se, evidentemente, muito vantajosa, uma vez que recorre a metodologias mais imediatas e práticas, reduz o número de ensaios *in vivo*, permite extrapolar os valores entre compostos pertencendo à mesma família e fornece informações valiosas sobre a direcção a tomar na síntese de novas substâncias (Lopes, 1997). Todavia, é necessário que essas determinações sejam efectuadas de uma forma criteriosa e com modelos que mimetizem eficazmente as estruturas ou os processos biológicos a estudar. Estes modelos devem, portanto, ter em consideração as mesmas características de micro-heterogeneidade dos sistemas naturais, mas serem suficientemente simples, manejáveis e apresentarem, a nível analítico, condições de reprodutibilidade aceitáveis.

As micelas, simples ou mistas, de lípidos, as vesículas e as micro-emulsões têm sido propostas, em diferentes áreas da Química e da Indústria, quer Tecnológica, quer Farmacêutica, como sistemas micro-heterogêneos que correlacionam um certo número de propriedades importantes associadas a um determinado comportamento de um sistema mais complexo, de modo a que a manipulação laboratorial e a utilização de métodos físico-químicos sejam possíveis.

II. EQUILÍBRIO HIDRÓFILO/LIPÓFILO E ACÇÃO DOS FÁRMACOS

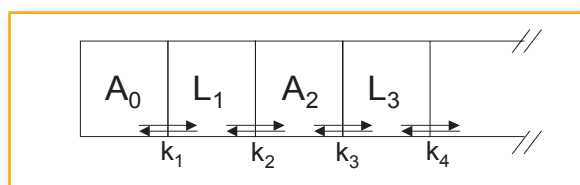
De uma forma geral, as substâncias com actividade farmacológica exercem os seus efeitos por interacção com estruturas específicas da célula, os receptores, usualmente localizados a nível da membrana celular, embora algumas classes de fármacos, como os anestésicos locais possam evidenciar uma acção não específica directamente sobre a membrana celular (Korolkovas e Burkhalter, 1988, Oswald e Guimarães, 2001). A extensão da acção farmacológica vai depender da afinidade de ligação do fármaco ao receptor e da concentração de fármaco no meio que o rodeia (Kubinyi, 1979).

O ciclo geral de um fármaco no organismo compreende as fases de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (Oswald e Guimarães, 2001). A absorção de um fármaco pode ser definida como a passagem deste do seu local de aplicação até à circulação sistémica. Como a via de administração mais difundida é a oral, a absorção de um fármaco é geralmente usada como sinónimo da entrada deste no tracto gastro-intestinal. Em adição a este local também a cavidade oral, o cólon, os túbulos do rim, a pele e a barreira hemato-encefálica são importantes locais de absorção (Kubinyi, 1979). Enquanto que a afinidade da ligação do fármaco ao seu receptor depende de

82 interações hidrofóbicas, iónicas e electrónicas, bem como de características topológicas quer do fármaco quer do seu receptor (Korolkovas e Burkhalter, 1988, Kubinyi, 1979), o transporte e a distribuição da maioria dos fármacos são considerados, geralmente, resultado da sua difusão passiva, que depende fundamentalmente da lipofilia do composto (Schanker, 1959; Houston *et al.*, 1974; Acquier *et al.*, 1983). A molécula em solução no líquido digestivo deverá dissolver-se nos lípidos da membrana para de seguida penetrar e atravessar as diferentes mucosas, introduzir-se na circulação geral e, finalmente, atingir o local do seu receptor (Kubinyi, 1979, Acquier *et al.*, 1983).

Hansch e Fujita propuseram o primeiro modelo para a descrição matemática das relações estrutura/actividade de fármacos, considerando o sistema biológico como sendo multicompartimentado e composto por fases aquosas alternando com fases lipídicas (Hansch e Fujita, 1964). A representação esquemática deste sistema de compartimentos pode ser observada na figura 1.

Fig. 1. Representação esquemática do modelo de multicompartimentos. A representa a fase aquosa e L a fase lipídica (adaptado de [5]).



Neste modelo multicompartimentado, a distribuição do fármaco é resultado da partição consecutiva entre fases de carácter hidrofílico e fases de carácter lipofílico e pode ser simulada por um determinado número de etapas de ligação entre as diferentes fases. Moléculas lipofílicas podem penetrar através da membrana para o compartimento aquoso seguinte, enquanto que moléculas hidrofílicas não conseguem atravessar a membrana, excepção feita às moléculas de baixo peso molecular, como a água ou a ureia, que são capazes de atravessar as membranas naturais por uma via hidrofílica (Oswald e Guimarães, 2001). Mas mais importante que a lipofilia do composto é o seu equilíbrio hidrófilo/lipófilo, uma vez que enquanto que os compostos altamente hidrofílicos tenderão a permanecer na primeira fase aquosa, os compostos muito lipofílicos permanecerão na primeira fase lipídica, devido à sua baixa solubilidade na fase aquosa. Só os fármacos com o equilíbrio hidrófilo/lipófilo adequado possuem a capacidade de atravessar tanto as barreiras lipídicas como as hidrofílicas e atingir a última fase aquosa do sistema, onde podem actuar com o receptor. Mesmo o último passo, a ligação da molécula de fármaco ao seu receptor, pode ser considerada como um passo de distribuição entre a superfície mais ou menos hidrofóbica do receptor e o meio hidrofílico que o rodeia (Kubinyi, 1979). Depois do modelo de Hansch, outros, matematicamente mais complexos, foram desenvolvidos, mas igualmente baseados no equilíbrio hidrófilo/lipófilo dos fármacos (Kubinyi, 1979).

Um parâmetro importante no equilíbrio hidrófilo/lipófilo dos fármacos é a sua capacidade de ionização. Se as restantes características da molécula o permitirem, a facilidade com que o fármaco atravessa as membranas será maior

para a forma não ionizada, mais lipossolúvel, do que para a forma ionizada (Oswald e Guimarães, 2001, Schanker, 1959). Como o grau de ionização da molécula condiciona a proporção desta que será absorvida, o conhecimento dos valores de pK_a e de pH no local de absorção são essenciais (Acquier *et al.*, 1983). Ainda para além da lipofilia, outros factores, como os topológicos ou os estereoelectrónicos, apresentam contribuições para a globalidade da distribuição e actividade biológica de fármacos (Basak *et al.*, 1984).

Durante a sua permanência no organismo, a maioria dos fármacos sofre a acção de enzimas que modificam mais ou menos acentuadamente a sua estrutura e, conseqüentemente, as suas características físico-químicas e farmacológicas. De uma forma geral, esta metabolização dos fármacos conduz à obtenção de compostos mais hidrossolúveis, mais aptos a serem excretados, normalmente por via renal ou via biliar e, menos frequentemente, por via pulmonar, sudorípara, lacrimal ou genital.

III. COEFICIENTE DE PARTIÇÃO

O coeficiente de partição de um soluto, geralmente expresso na literatura por K , K_D , K_p , D ou P , é definido como a razão, no equilíbrio, entre as concentrações do soluto em duas fases imiscíveis por entre as quais o soluto pode partilhar (Katz e Diamond, 1974a). Leo *et al.* consideraram que, desde que os coeficientes de actividade se mantenham constantes, a relação de concentrações de quaisquer espécies moleculares nas duas fases (C_1 e C_2) em equilíbrio uma com a outra, é uma constante definida por (Leo *et al.*, 1971):

$K = \frac{C_2}{C_1}$ Esta definição assume que não existem interações soluto/soluto significativas, bem como interações específicas soluto/solvente fortes (Leo *et al.*, 1971). Um dos primeiros conceitos estabelecidos acerca do coeficiente de partição foi que a razão de concentrações de soluto distribuído pelas duas fases é constante e independente dos volumes relativos de cada uma das fases (Leo *et al.*, 1971).

Segundo Leo *et al.*, a lei de partição pode ser considerada uma extensão da lei de Henry, em que a massa de gás dissolvido por unidade de volume de um líquido é proporcional à pressão parcial do gás na fase aquosa, que por sua vez é proporcional à concentração de moléculas na fase gasosa (Leo *et al.*, 1971). A partição pode ser tratada, em termos de termodinâmica clássica, como um processo de equilíbrio onde a tendência de uma molécula isolada de soluto para passar de um solvente ao outro é uma medida da sua actividade nesse solvente e pode ser relacionada da maneira habitual com outras funções de actividade commumente medidas, como a pressão parcial, a pressão osmótica e o potencial químico (Leo *et al.*, 1971).

III.1. COEFICIENTE DE PARTIÇÃO ENTRE SOLVENTES IMISCÍVEIS

O compartimento lipídico do organismo é inevitável, pois as membranas, de natureza fosfolipídica, constituem parte do trajecto desde o local de admi-

84 nistração até ao compartimento plasmático. Por esse motivo, desde finais do século XVIII que se reconhecem as características de lipossolubilidade dos fármacos como fundamentais para a sua acção terapêutica. Pode considerar-se mesmo que já desde há vários séculos o conceito da distribuição de um soluto entre duas fases nas quais é solúvel é usado em diversas aplicações, como o isolamento de essências naturais a partir de flores (Leo *et al.*, 1971).

A questão de como as moléculas atravessam as membranas celulares tem sido objecto de estudo desde os primeiros trabalhos de Overton, em 1899, que resultaram na chamada “Regra de Overton”, segundo a qual os coeficientes de permeabilidade estão correlacionados com os coeficientes de partição óleo/água (cit. em (Walter e Gutknecht, 1986). Diversos estudos foram posteriormente realizados com as mais variadas fases apolares, incluindo azeite, clorofórmio, benzeno, ciclohexano, n-hexano, álcool oleico, heptano, hexadecano e óleos minerais (Schanker, 1959; Hansch e Dunn, 1972.; Pauletti e Wunderli-Allenspach, 1994). Posteriormente, o coeficiente de partição do fármaco entre duas fases imiscíveis foi relacionado com parâmetros de “ligação hidrofóbica” em sistemas biológicos e farmacológicos. O uso do coeficiente de partição estendeu-se à determinação de equilíbrios de dissociação, à sua relação com o balanço hidrófilo/lipófilo de moléculas, a estudos com meios de troca iónica, a medidas da capacidade de estabelecer ligações hidrofóbicas, a estudos de estrutura /actividade e a medidas de dissolução e velocidade de partição de fármacos (Leo *et al.*, 1971).

Hansch e seus colaboradores, recolhendo e analisando dados entretanto publicados, sugeriram o uso do coeficiente de partição entre o 1-octanol e a água, K_{OA} , como o indicador mais conveniente para o estudo das relações entre constantes de partição e a actividade farmacológica de substâncias (Leo *et al.*, 1971; Hansch e Dunn, 1972). Estes autores sugeriram que os resultados dos coeficientes de partição de compostos bioactivos entre um solvente orgânico, principalmente o octanol, e a água apresentam uma boa correlação com a capacidade destes compostos atravessarem as biomembranas, e, conseqüentemente, com a sua actividade biológica. Este pressuposto foi adoptado genericamente em estudos de QSAR - relação quantitativa estrutura-actividade (Scherrer e Howard, 1977; Martin, 1981) e em estudos sobre biodisponibilidade de fármacos (Houston *et al.*, 1975). Os coeficientes de partição solvente orgânico/água têm sido medidos extensamente desde os primeiros estudos e os dados obtidos são, ainda hoje, aplicados às mais diversas áreas, desde o desenho racional de novos fármacos ao desenvolvimento de formulações galénicas (Alcorn *et al.*, 1993; Lalor *et al.*, 1994; Lalor *et al.*, 1995; Lázníèek e Lázníèková, 1995).

O principal método para a determinação do K_{OA} é o método da agitação em frasco, introduzido por Leo *et al.* (Leo *et al.*, 1971), mas este parâmetro pode ser determinado ainda por outras técnicas, como potenciometria (Takács-Novák e Avdeef, 1996), e mais recentemente, determinações baseadas em técnicas cromatográficas, como a cromatografia líquida micelar (García e Marina, 1994; Herbert e Dorsey, 1995) e microextração em fase sólida (Dean *et al.*, 1996).

No entanto, já desde pouco depois dos primeiros estudos se evidenciaram falhas no sistema de partição octanol/água. Hansch e Clayton referiram uma perda de correlação linear com a actividade biológica para valores de K_{OA} relativamente elevados, indicando que níveis demasiado altos de hidrofobicidade da molécula podem inibir a resposta biológica, fenómeno que foi denominado “resposta parabólica”. Este efeito foi atribuído às características de transporte relativamente lento destes compostos altamente hidrofóbicos (Gobas *et al.*, 1988) e tratamentos matemáticos elaborados foram aplicados para melhorar a correlação K_{OA} /actividade biológica (Cooper *et al.*, 1981). É, no entanto, mais razoável esperar para uma série de compostos com K_{OA} elevados, diferenças no seu comportamento de partição nas fases lipídicas do organismo relacionadas com interacções específicas com determinados componentes das membranas biológicas, que não são mimetizadas pelo octanol.

Os solventes orgânicos formam uma fase compacta e isotrópica quanto às suas propriedades físico-químicas, observando-se uma continuidade ao longo de toda a fase, enquanto que a bicamada lipídica pode ser considerada uma fase interfacial de matéria na qual as propriedades físicas variam com a distância à superfície, ao longo do eixo normal da bicamada (De Young e Dill, 1988). As propriedades físicas das membranas que se podem fornecer como exemplo de inconstância com a profundidade são inúmeras. Por exemplo, existe um gradiente de desordem nas cadeias carbonadas: as cadeias estão mais alinhadas perto da interface e essa ordem diminui com a distância à superfície (Hubbell e McConnell, 1971). A constante dieléctrica também varia com o local da bicamada lipídica. Adicionalmente, enquanto que os solventes orgânicos formam duas fases distintas separadas por uma interface, as membranas lipídicas possuem elevadas relações superfície/volume, e as propriedades das interfaces dependem da densidade superficial, enquanto que nas fases compactas esse fenómeno não se observa (De Young e Dill, 1988).

Marqusee e Dill desenvolveram uma teoria acerca da partição de solutos em bicamadas, cujos principais pressupostos são os seguintes (Marqusee e Dill, 1986):

- haverá um gradiente de concentração de soluto na bicamada, em contraste com a distribuição uniforme esperada numa fase compacta;
- a ordem parcial das cadeias deverá desfavorecer a retenção do soluto na bicamada relativamente à fase compacta de natureza amorfa;
- a incorporação do soluto deverá diminuir significativamente com o aumento da densidade superficial das cadeias.

Existem evidências experimentais que apoiam os pressupostos desta teoria. Alguns estudos apontam para um coeficiente de partição mais elevado em solventes orgânicos do que em membranas lipídicas, bem como valores de entropia de transferência de solutos menores para esses solventes (Katz e Diamond, 1974a). De Young e Dill relataram a exclusão do benzeno de membranas lipídicas por aumento da densidade superficial das cadeias dos fosfolípidos, sendo este efeito independente da natureza do agente usado

86 para alterar a densidade: temperatura, colesterol ou alteração do comprimento das cadeias carbonadas dos fosfolípidos. Mas o comportamento dos solutos em membranas não é homogêneo. De facto, a sua interacção com a bicamada envolve uma série complexa de eventos que incorporam parâmetros como efeitos electrónicos e estéricos de substituintes, influência do volume e formato da molécula e parâmetros energéticos inerentes ao processo de transferência (Betageri e Rogers, 1989).

A correlação entre os valores de coeficiente de partição solvente orgânico simples / meio aquoso e a actividade biológica de um fármaco apresenta bons resultados apenas quando esta é resultado de interacções de natureza apolar com a bicamada (Ong *et al.*, 1995). De facto, a partição de uma espécie molecular no sistema octanol/água é devida fundamentalmente à forma não ionizada da molécula (Krämer *et al.*, 1997; Avdeef *et al.*, 1998), ao contrário do que se observa com as membranas naturais, que são capazes de estabelecer interacções com as moléculas na sua forma ionizada. Claramente, o sistema octanol/água é insuficiente para contabilizar certas características críticas das membranas biológicas, que possuem grupos anfipáticos capazes de estabelecerem interacções electrostáticas fortes. Pode apresentar-se o exemplo relatado por Herbette *et al.* (1994), que determinaram um valor de K_{OA} para o fármaco amlodipina cerca de uma ordem de grandeza mais baixo que para o fármaco da mesma classe nimodipina. Pelo contrário, o seu valor de coeficiente de partição encontrado em membranas biológicas foi cerca de 3 vezes superior ao da nimodipina. Estas diferenças podem ser compreendidas à luz da informação estrutural e de modelos moleculares dos fármacos na bicamada: enquanto que em octanol o fármaco se encontra disperso aleatoriamente pelo solvente, numa bicamada ocupa uma determinada posição definida, consoante as interacções hidrofóbicas ou iónicas que estabelece. O próprio Hansch sugeriu que o octanol é um modelo racional porque modela as interacções moleculares apolares entre o soluto e a membrana, mas apontou para a necessidade de se procurarem modelos de biomembranas mais eficazes (Hansch e Dunn, 1972).

III.2. DETERMINAÇÃO DOS COEFICIENTES DE PARTIÇÃO AGREGADO ANFIFÍLICO/ÁGUA

Técnicas cromatográficas com compostos como octadecilsilica na fase estacionária têm vindo a ser desenvolvidas como métodos alternativos para a determinação da lipofilia de substâncias (Schmidt *et al.*, 1994), mas este sistema, contendo apenas hidrocarbonetos apolares, herda a mais séria limitação do sistema octanol/água, que é a falta de similaridade estrutural com as membranas biológicas. O recurso a sistemas estruturados, constituídos por moléculas anfipáticas, como as micelas, tornou-se apelativo devido à facilidade de obtenção e manipulação, estabilidade físico-química e versatilidade apresentadas por estes sistemas, que têm sido largamente usados como modelos de biomembranas.

As membranas biológicas naturais foram um alvo óbvio para estudos de partição de espécies moleculares. Os primeiros estudos foram efectuados com membranas de eritrócitos como fase lipídica (Seeman *et al.*, 1971). Mas, imediatamente após o desenvolvimento dos lipossomas, Katz e Diamond sugeriram o seu uso neste tipo de estudos e estabeleceram que os coeficientes de partição obtidos em suspensões aquosas de lipossomas eram semelhantes aos obtidos em membranas naturais (Katz e Diamond, 1974a; Katz e Diamond, 1974b; Diamond e Katz, 1974). Os lipossomas apresentam-se como um modelo mais efectivo de uma membrana celular do que um solvente isotrópico ou uma micela, devido à estrutura em bicamada das suas membranas. Uma diferença importante entre lipossomas e solventes orgânicos é que aqueles são capazes de acomodar moléculas carregadas por vezes numa grande extensão (Pauletti e Wunderli-Allenspach, 1994; Austin *et al.*, 1995).

Vários trabalhos tiveram como principal objectivo a comparação dos resultados obtidos com ambos os sistemas (octanol/água e lipossomas/água) e a comparação destes com os resultados conseguidos com membranas naturais ou com determinados parâmetros farmacocinéticos da actividade dos fármacos “*in vivo*” (Alcorn *et al.*, 1993, Gobas *et al.*, 1988; Betageri e Rogers, 1989; Betageri e Rogers, 1988; Choi e Rogers, 1990). De uma forma geral, os coeficientes de partição obtidos com lipossomas apresentam melhores correlações com a actividade biológica dos fármacos do que os K_{OA} . Como foi já referido, para valores de K_{OA} pouco elevados, a correlação destes com parâmetros biológicos e com dados obtidos com lipossomas é satisfatória, mas para valores elevados o uso deste sistema torna-se insuficiente. A par da lipossolubilidade dos compostos, o seu tamanho parece ser um factor importante para a perda de correlação entre K_{OA} e partição lipossoma/água. Estudos com séries homólogas de compostos evidenciam uma perda de correlação para volumes molares superiores a 230 cm³/mol, que parece ser devida à maior energia por unidade de volume necessária para acomodar o soluto na fase membranar. Isto é provavelmente o resultado da natureza estrutural dos fosfolípidos da membrana, trazendo como consequência que moléculas volumosas e ramificadas possuam menor coeficiente de partição lipossoma/água do que os seus análogos de cadeia alongada (Diamond e Katz, 1974).

Para além dos lipossomas (Matos, 2001), outros sistemas heterogéneos têm sido usados como modelos das membranas celulares, como micelas (Moutinho, 2000), monocamadas lipídicas (Seelig, 1987) e células (Knaub *et al.*, 1995).

IV. CARACTERIZAÇÃO DE MODELOS BIOMEMBRANARES

IV.1. MICELAS

Na figura 2 pode observar-se a representação de uma micela esférica, com os seus grupos polares voltados para a solução aquosa e as cadeias carbonadas hidrofóbicas para o interior.

Uma micela possui um diâmetro entre 30 e 60 Å (Fendler, 1982) e é composta por um determinado número de moléculas do monómero, referido pelo

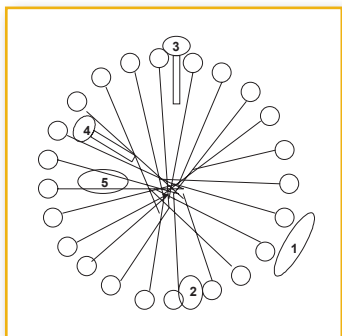


Fig. 2. Representação esquemática de uma micela esférica e dos locais de ligação possíveis de solutos em micelas. O significado dos números 1 a 5 são referidos no texto.

número de agregação, $Ag\#$, que irá determinar a forma e o tamanho da estrutura organizada final. Esse número de agregação varia geralmente entre 50 e 100 (Sudhölter *et al.*, 1980). Considera-se usualmente que a estrutura micelar típica abrange (Garcia e Sanz-Medel, 1986; Grieser e Drummond, 1988; Pramauro e Pelizzetti, 1996):

- um núcleo, constituído pelas cadeias hidrocarbonadas, virtualmente desprovido de água; as cadeias hidrocarbonadas podem dobrar, permitindo assim o contacto de alguns grupos CH_3 terminais com a interface;
- uma camada mais externa, constituída pelos grupos polares e pelos contra-íões não dissociados, denominada camada de Stern; os grupos polares não cobrem completamente o interior lipófilo, pelo que existe uma grande área de contacto hidrocarboneto/solução aquosa;
- uma região adjacente à camada de Stern, que inclui uma elevada densidade de contra-íões, a dupla camada de Gouy-Chapman.

Esta organização estrutural traz como consequência as propriedades apresentadas por estes agregados, bem como a capacidade de solubilizarem moléculas pouco solúveis em determinado solvente. O tipo de interações que os solutos vão estabelecer com a micela depende das propriedades do detergente e do próprio soluto. A localização das moléculas solubilizadas nas micelas pode ser evidenciada por técnicas como difracção de raios-X, absorção de ultra-violeta/visível (UV/Vis), fluorescência, ressonância magnética nuclear (RMN) ou ressonância electromagnética (ESR) (Pramauro e Pelizzetti, 1996). Os principais locais de interacção de solutos numa micela podem ser esquematicamente observados na figura 1.4 e descritos resumidamente como (Pramauro e Pelizzetti, 1996):

- 1- moléculas com características polares podem sofrer adsorção à superfície micelar;
- 2- moléculas com características polares podem ainda situar-se entre as “cabeças” hidrofílicas;
- 3- moléculas com características anfífilas podem interagir com os grupos constituintes da “cabeça” e intercalarem-se na zona apolar entre as “caudas”;
- 4- moléculas com maior proporção lipófila podem inserir-se mais profundamente;
- 5- moléculas não-polares podem situar-se no núcleo da micela.

Devido ao carácter dinâmico apresentado pelas estruturas micelares, determinada localização exibida por um soluto corresponde a uma posição média ao longo do tempo.

IV.2. VESÍCULAS

As vesículas compostas de fosfolípidos são usualmente denominadas lipossomas, enquanto que o termo vesícula é geralmente atribuído às estruturas formadas por outros agentes anfílicos (Pramauro e Pelizzetti, 1996). Os lipossomas (do grego *lipos* (gordura) e *sôma* (corpo)) foram inicialmente referidos por Alec Bangham e seus colaboradores, em 1965, que descreveram pela primeira vez como a dispersão de fosfolípidos em água produzia espontaneamente estruturas membranares fechadas, que concluíram serem formadas por diversas camadas de fosfolípidos concêntricas, separadas por compartimentos aquosos. Os lipossomas constituem modelos valiosos das membranas biológicas pois, sendo compostos pelos mesmos constituintes das membranas naturais, formam uma estrutura idêntica a estas.

IV.2.1. ESTRUTURA GERAL DAS VESÍCULAS

Os lípidos constituintes das membranas naturais distribuem-se por quatro principais grupos: fosfolípidos, esfingolípidos, glicolípidos e esteróis (Jones e Chapman, 1995). Deste último grupo, o colesterol é o representante mais importante. A estrutura básica destes lípidos pode ser observada na figura 3. Os fosfolípidos são derivados do glicerol e os esfingolípidos da esfingosina. As cadeias alquilo (R_1 e R_2) podem ser saturadas ou insaturadas e geralmente situam-se entre C_{10} a C_{28} .

Os lípidos naturais exibem, de maneira geral, uma grande diversidade na composição das cadeias carbonadas, ao contrário dos lípidos sintéticos, que podem apresentar uma constituição muito homogénea. Devido à síntese metabólica dos ácidos gordos no organismo, estes apresentam um número par de carbonos na sua cadeia, enquanto que os ácidos gordos de síntese podem possuir um número ímpar destes átomos (Lasic, 1993). Os ácidos gordos saturados mais frequentes nas membranas naturais são o mirístico, o palmítico e o esteárico, com 12, 14 e 16 grupos metilénicos, respectivamente. Dos insaturados, o mais importante é o ácido oleico, com 18 carbonos e uma dupla ligação no meio da cadeia. Os ácidos gordos saturados são muito flexíveis, possuindo cada ligação simples a possibilidade de rotação, ao contrário dos insaturados que são moléculas mais rígidas. A ligação dupla *cis*, muito mais comum, provoca uma conformação em ângulo de cerca de 30° , o que dificulta o empacotamento destas moléculas na bicamada.

Muitas das propriedades físicas dos lipossomas, como a sua estabilidade, permeabilidade ou temperatura de transição de fase, dependem do comprimento e grau de saturação dos fosfolípidos que os constituem. Os fosfolípidos naturais geralmente possuem uma cadeia mais longa e /ou mais insaturada na posição 2 do esqueleto do glicerol, enquanto a outra ocupa a posição 1 (Lasic, 1993; New, 1990).

90 Os grupos assinalados na figura 3. com o símbolo X constituem os grupos polares dos lípidos. Os principais substituintes que podem ser encontrados nas membranas biológicas estão esquematizados na figura 4.

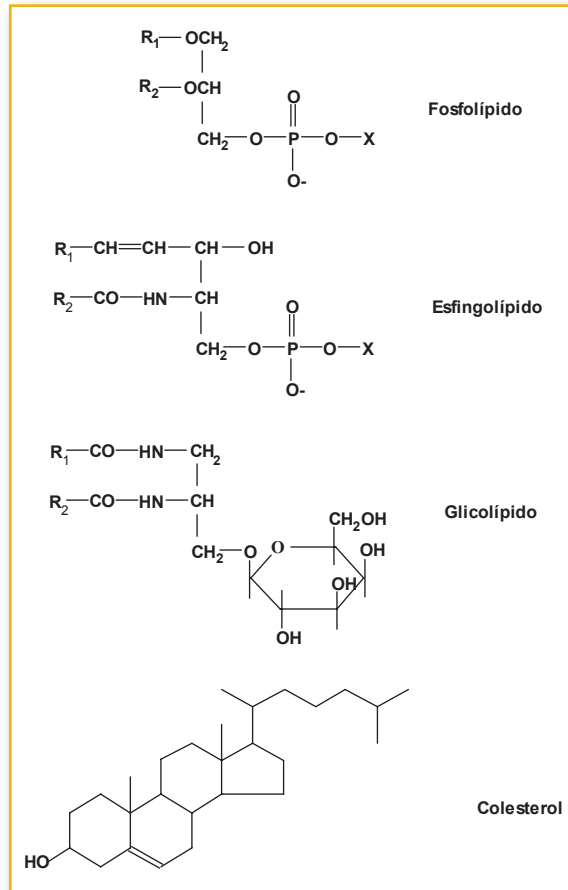


Fig. 3. Estrutura química dos principais grupos de lípidos que constituem a membrana celular.

Os fosfolípidos contendo colina, geralmente denominados lecitinas, são os mais abundantes na natureza. São moléculas zwitteriônicas a pH fisiológico, pois o grupo amônio quaternário apresenta carga positiva e o grupo fosfato

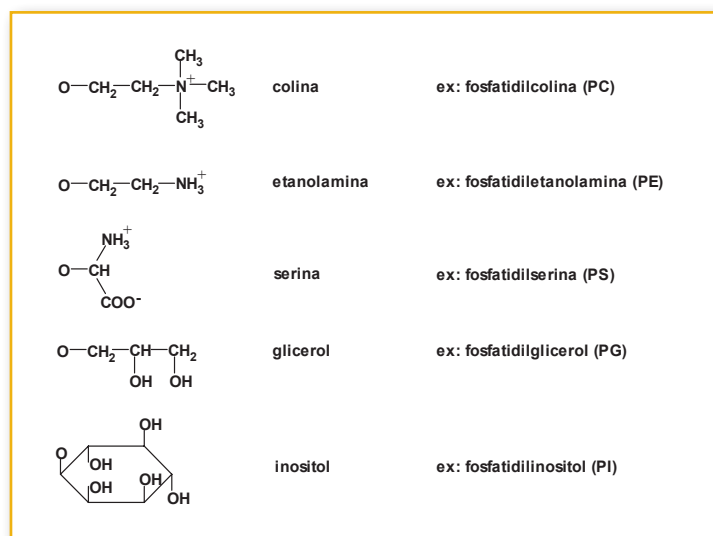


Fig. 4. Estrutura química dos principais grupos polares encontrados nos fosfolípidos de origem natural.

está desprotonado a esse valor de pH. Com a exceção da fosfatidilcolina e da fosfatidiletanolamina, todos os restantes fosfolípidos são carregados negativamente (New, 1990), razão pela qual as membranas biológicas apresentam geralmente uma carga superficial negativa, importante para muitos dos processos fisiológicos.

Cada classe mencionada, como a fosfatidilcolina ou lecitina (do grego *leki-thos* (gema do ovo)), compreende uma grande variedade de moléculas, conforme o tipo de ácidos gordos ligados ao esqueleto do glicerol. A lecitina de origem natural, como a extraída da gema do ovo ou da soja, é uma mistura de várias moléculas, com cadeias carbonadas de diversos comprimentos e diferentes graus de insaturação. O ácido gordo mais abundante na lecitina da gema do ovo é o ácido palmítico (35,3 %), situado preferencialmente na posição 1, seguido do ácido oleico, encontrado principalmente na posição 2 (New, 1990). Por técnicas de síntese e purificação é possível obter-se moléculas compostas apenas por determinadas cadeias lipídicas, como DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina) ou DMPC (dimiristoilfosfatidilcolina). Este tipo de fosfolípidos semi-sintéticos é usualmente usado em pesquisa, pois apresenta um comportamento muito mais facilmente caracterizável em termos da temperatura de transição de fase e de parâmetros termodinâmicos, em comparação com as populações heterogêneas que constituem os fosfolípidos naturais (Lasic, 1993).

Sendo a lecitina o maior componente das membranas naturais, é a principal molécula usada na preparação de lipossomas para as mais variadas aplicações. É electricamente neutra, relativamente inerte quimicamente e passível de ser obtida a baixo custo (New, 1990). A lecitina dá origem a lipossomas electricamente neutros, mas a sua carga pode ser modificada pela incorporação de moléculas anfipáticas carregadas, como o fosfatidilglicerol ou o fosfatidilinositol para a obtenção de lipossomas carregados negativamente, ou a estearilamina para a obtenção de lipossomas com carga positiva.

Além de fosfolípidos, os lipossomas podem incluir também outras moléculas lipídicas. O colesterol, por exemplo, é usado para reduzir a difusão dos fármacos hidrossolúveis para o exterior das vesículas, bem como para aumentar a estabilidade destas na corrente circulatória.

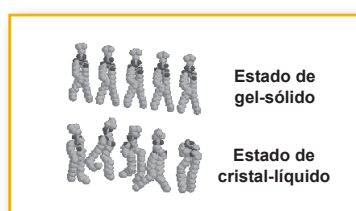
Para além dos lípidos naturais ou semi-sintéticos referidos, existem também moléculas de origem sintética, que têm vindo a ser desenvolvidas mais recentemente, com capacidade de formarem vesículas, como o di-hexadecilfosfato de sódio (DHP) ou o cloreto de dioctadeciltrimetilamónio (DODAC).

Uma característica importante das bicamadas lipídicas é a existência de uma temperatura, específica para cada lípido, onde a organização dos fosfolípidos sofre uma alteração brusca. As bicamadas fosfolípídicas podem apresentar-se em duas fases termodinamicamente distintas, uma fase de grande ordenação, designada por estado de gel-sólido e, para temperaturas mais elevadas, uma fase mais fluída denominada cristal -líquido (Jones e Chapman, 1995; Lasic,

1993; New, 1990). A alteração no arranjo das cadeias carbonadas em cada estado pode ser observada na figura 5. A temperatura de passagem de uma fase à outra é denominada temperatura de transição de fase, T_c , característica para cada lípido, e que compreende um intervalo de temperaturas para lípidos de composição heterogénea. A amplitude do intervalo de temperaturas, que pode abranger mais de 10 °C, depende fortemente da composição lipídica da amostra, podendo estar ausente para misturas de lípidos (Lasic, 1993). Antes da T_c , muitos dos lípidos sintéticos puros exibem uma pré-transição, à temperatura da qual (T'_c) as cadeias torcidas se orientam paralelamente ao eixo da bicamada.

A temperatura de transição de fase dos fosfolípidos depende da natureza do grupo polar, bem como do comprimento e do grau de insaturação das cadeias

Fig. 5. Representação esquemática da organização estrutural apresentada pelas cadeia carbonadas de fosfolípidos no estado de cristal-líquido e de gel-sólido.



acílicas. Em geral, aumenta com o comprimento das cadeias dos ácidos gordos esterificantes e diminui com o grau de insaturação. A T_c descrita para a dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) é de 23,5 °C e para a dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) de 41,4 °C (Lasic, 1993). À lecitina de origem natural não se pode atribuir uma temperatura definida de transição de fase devido à sua composição heterogénea. Em relação à fosfatidilcolina da gema do ovo (EPC), por exemplo, enquanto certos autores não lhe atribuem uma transição de fase (Lasic, 1993), outros referem a T_c de -15 °C a -7 °C (New, 1990; Tyrrell *et al.*, 1976). A temperatura de transição de fase pode ser determinada por calorimetria de varrimento diferencial (DSC-Differential scanning calorimetry) (Jones e Chapman, 1995).

A formação da estrutura do lipossoma só é possível quando os lípidos constituintes são manipulados a uma temperatura superior à respectiva T_c . Este valor determina a temperatura mínima requerida para a água penetrar entre as camadas lipídicas e os lipossomas se formarem (Jones e Chapman, 1995). Após a formação da estrutura, a temperatura pode descer abaixo da T_c sem destruição das vesículas formadas.

IV.2.2. PREPARAÇÃO DAS VESÍCULAS

O processo clássico de preparação de lipossomas, iniciado por Bangham em 1965, denomina-se método da hidratação do filme lipídico (Lasic, 1993). Neste método, uma solução de lípido num solvente orgânico é evaporada à secura nas paredes de um balão de vidro, por evaporação em vácuo ou convecção, formando-se um filme fino e o mais homogéneo possível. O filme é então hidratado com uma solução aquosa, ocorrendo o inchamento do lípido

e a formação espontânea de bicamadas e vesículas (Lasic, 1993; New, 1990; Hope *et al.*, 1986).

Este processo de preparação pode sofrer algumas variações, nomeadamente quanto ao solvente orgânico utilizado, à possível adição de contas de vidro, à forma de secagem do lípido e aos parâmetros de agitação, como o tempo, a intensidade, o modo e a temperatura de agitação (Lasic, 1993). No entanto, a maioria destas variações origina MLV, com uma grande heterogeneidade de tamanhos e formas, com uma pequena percentagem de SUV e LUV, bem como de lipossomas multicompartimentados e lipossomas gigantes, até várias dezenas de μm de diâmetro (Hope *et al.*, 1986). A composição lipídica e a concentração, bem como o modo de hidratação, a fase aquosa usada e o tempo de hidratação afectam a preparação obtida (Woodle e Papahadjopoulos, 1997).

IV.2.3. ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DAS VESÍCULAS

Em armazenamento prolongado, os lipossomas podem sofrer diversos tipos de alterações ao longo do tempo, dividindo-se essas alterações em físicas, químicas e biológicas (Lasic, 1993). Fisicamente, e dependendo grandemente da sua constituição bem como do meio envolvente, os lipossomas podem sofrer agregação, fusão, deposição, ruptura membranar ou, no caso de encapsularem solutos, perda do seu conteúdo (Lasic, 1993; New, 1990). Quimicamente, os fosfolípidos que constituem os lipossomas podem sofrer dois grandes processos degenerativos: hidrólise e oxidação (Lasic, 1993; New, 1990; Grit e Crommelin, 1993; Grit *et al.*, 1993a). A oxidação dos fosfolípidos acontece preferencialmente com os fosfolípidos poli-insaturados, como é o caso da EPC. Essa oxidação dá-se, na ausência de oxidantes específicos, via um mecanismo de radicais livres (Grit e Crommelin, 1993). A presença de oxigénio, luz e elevadas temperaturas intensifica o processo, pelo que é importante a protecção dos lipossomas contra estes factores. A hidrólise dos fosfolípidos origina lisofosfolípidos e ácidos gordos livres como produtos iniciais, que se pensa possuírem a capacidade de interagir com a membrana, contribuindo para a sua instabilidade física (Grit *et al.*, 1989). A hidrólise é fortemente afectada pelo pH do meio, verificando-se um efeito mínimo para o valor de pH próximo de 6,5, havendo aumento de hidrólise, catalizada por ácido ou por base, para valores de pH inferiores e superiores (Grit e Crommelin, 1993; Grit *et al.*, 1993b). Após cerca de 50 h a pH 4,0, alguns autores observaram uma hidrólise de cerca de 25% da lecitina (Grit *et al.*, 1993b; Zuidam e Crommelin, 1995). A temperatura é também um factor promotor da hidrólise (Grit e Crommelin, 1992) enquanto que a força iónica parece não ter influência neste processo (Grit *et al.*, 1993b).

IV.2.4. CONFIGURAÇÃO E PROPRIEDADES MOLECULARES DOS FOSFOLÍPIDOS

A estrutura e a dinâmica da bicamadas têm um papel fundamental na funcionalidade das membranas biológicas. A compreensão dos fenómenos fisiológicos e da acção dos fármacos requer a descrição pormenorizada da

94 estrutura da bicamada e das consequências dessa estrutura para a acção de moléculas endógenas e exógenas.

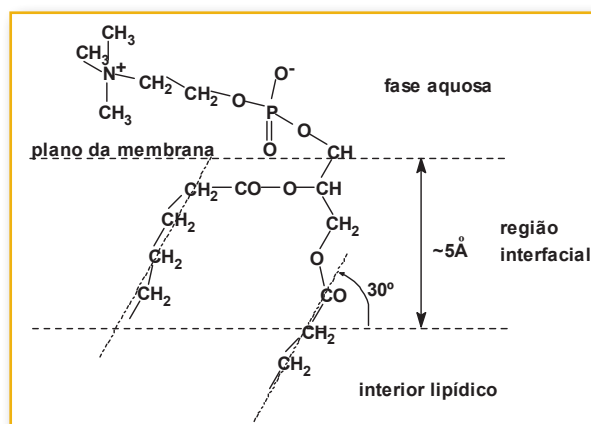


Fig. 6. Representação esquemática da conformação da fosfatidilcolina na bicamada lipídica (adaptado de [56]).

Nas bicamadas lipídicas, as moléculas da lecitina encontram-se dispostas com o esqueleto do glicerol alinhado de forma aproximadamente perpendicular ao plano da membrana (Seelig *et al.*, 1987; Noy, 1992), conforme se pode observar na figura 6. O grupo fosfocolina, por seu lado, dispõe-se numa linha grosseiramente paralela ($\sim 30^\circ$) à superfície da membrana (Seelig *et al.*, 1987). É de prever que esta conformação diminua a distância entre as cargas positivas e negativas na molécula e parece ser a conformação adoptada também pela PC, PE e PG nas membranas biológicas. O grupo polar que constitui a “cabeça” dos fosfolípidos não parece ser dotado de grande liberdade de rotação à custa das ligações de hidrogénio que estabelece (Seelig *et al.*, 1987). Devido aos três grupos metilénicos ligados ao azoto quaternário, a colina forma um grupo muito compacto, ocupando uma área da membrana (42 \AA^2) maior do que a área das duas cadeias acídicas ($\sim 39 \text{ \AA}^2$). Para compensar este facto, as cadeias hidrocarbonadas deverão dispor-se numa conformação inclinada num ângulo de 58° relativamente ao plano da membrana, por forma a preencher o espaço livre criado pelos grupos de “cabeça” e para aumentar a proximidade entre cadeias adjacentes, maximizando interações do tipo forças de Van der Waals (New, 1990).

Devido ao pequeno ângulo que o grupo fosfatidilcolina forma com a superfície da membrana, existe um momento dipolar estimado em 19 D, que corresponde a um potencial dipolar de aproximadamente 90 mV (Seelig *et al.*, 1987).

A parte da molécula fosfolipídica cujo movimento é mais restrito é o grupo glicerol. Os grupos metilénicos acídicos mais próximos do grupo polar apresentam um elevado grau de rigidez, até à proximidade do carbono 9, e à medida que se vai percorrendo a cadeia a liberdade destes grupos vai aumentando (New, 1990). A viscosidade do meio vai, então, diminuindo à medida que se penetra na cadeia carbonada (Fendler, 1982), bem como a constante dielétrica do meio, que diminui de cerca de 80 em solução aquosa para cerca

de 30 perto dos grupos polares e 2,5 no interior da cadeia hidrocarbonada, valores semelhantes aos encontrados nas membranas biológicas (Cevc, 1990).

Nas cadeias hidrocarbonadas é possível encontrar uma certa quantidade de água, na forma ligada (Phillips, 1972). Cada molécula de fosfatidilcolina parece estar associada a 23 moléculas de água, estando 11 situadas no interior da bicamada e 12 a hidratar o grupo polar, distribuídas por cinco classes de ligação à membrana: ocupando a concha de hidratação mais interna e mais fortemente ligada, ocupando a concha de hidratação principal, aprisionadas, ligadas fracamente ou livres (Fendler, 1982).

O elevado grau de curvatura encontrado nas vesículas esféricas requer que a superfície externa seja maior do que a superfície interna (Fendler, 1982). O folheto externo da bicamada parece ter uma espessura de 21 Å e o interno cerca de 16 Å. Cada molécula de EPC ocupa um volume de 1 253 Å³ e uma área de 74 Å² no folheto externo e 61 Å² no interno (Huang e Mason, 1978). Os fosfolípidos situados na face interna, especialmente em vesículas pequenas, têm as suas cadeias hidrofóbicas mais comprimidas do que numa bicamada plana (Cornell *et al.*, 1980).

As bicamadas são estruturas mais rígidas que as micelas, embora existam trocas de monómeros entre os agregados e a solução, que é da ordem de milissegundos para as micelas e de várias horas para as bicamadas de fosfolípidos (Fendler, 1982). Assim, à escala das medidas habitualmente realizadas a vesícula é essencialmente uma entidade estática (Grieser e Drummond, 1988). O interior das vesículas apresenta uma viscosidade muito superior à das micelas, chegando a atingir 200 cP (Fendler, 1982).

Embora a estrutura da bicamada seja estável, as moléculas dos fosfolípidos têm uma grande liberdade dentro da membrana, estando as cadeias carbonadas em constante movimento produzido pela rotação sobre as ligações C-C. As moléculas de PC que compõem a bicamada apresentam movimentos moleculares variados: movimentos de rotação em torno do seu eixo, movimentação segmentar das caudas, movimentos de “flip-flop”, em que há troca de moléculas entre os dois folhetos, difusão lateral e trocas intervesiculares de fosfolípidos (ver figura 7) (Fendler, 1982).

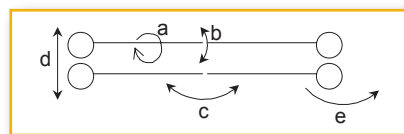


Fig. 7. Movimentos possíveis dos fosfolípidos na bicamada: a) rotação; b) movimentação segmentar; c) movimentos de “flip-flop”; difusão lateral; e) troca intervesicular (adaptado de [49]).

Estudos computacionais demonstraram que a bicamada possui uma estratificação elevada (Mouritsen e Jørgensen, 1998). Partindo do meio aquoso externo para a superfície das membranas, encontra-se uma camada de água associada à membrana, situada a cerca de 20-30 Å do centro da bicamada, e que possui propriedades diferentes da água de uma solução aquosa, nomeadamente uma ordenação maior e uma constante dielétrica menor, possuindo uma menor capacidade de estabelecer pontes de hidrogénio. A

96 camada seguinte, situada a 20-15 Å do centro, tem características hidrofílicas/hidrofóbicas e inclui água de ligação, os grupos polares e parte do início das cadeias hidrocarbonadas. Nesta camada podem estabelecer-se ligações não covalentes com moléculas anfipáticas. Estas duas camadas constituem a interface e formam a barreira de desidratação crítica para iões e solutos que se dissolvem e atravessam a membrana (Mouritsen e Jørgensen, 1998). Mais interiormente encontra-se o núcleo hidrocarbonado, constituído por uma camada mais ordenada de segmentos de cadeias e uma outra, mais interna, a 5 Å do centro, conformacionalmente mais desordenada e estruturalmente semelhante ao decano líquido. As diferenças estruturais encontradas nestas camadas possuem um importante papel nas características de difusão de solutos e na orientação de moléculas anisotrópicas após a sua penetração nas cadeias hidrocarbonadas (Mouritsen e Jørgensen, 1998).

Uma característica interessante conferida por esta estrutura da membrana é a sua permeabilidade. As bicamadas são permeáveis não só a moléculas com hidrofobicidade suficiente para entrarem na fase não polar, mas também a moléculas pequenas com elevada polaridade. A corrente osmótica de água através das bicamadas está bem estudada e, dependendo da composição lipídica, o coeficiente de permeabilidade osmótico nestas estruturas situa-se entre 0,2 e 100 $\mu\text{m/s}$ (Gier, 1987).

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

V. UTILIZAÇÃO DOS MODELOS BIOMEMBRANARES

O conhecimento dos fenómenos envolvidos no transporte das substâncias com interesse farmacológico através das membranas e dos fluídos biológicos, bem como das propriedades físico-químicas das suas moléculas, são de extrema importância na actividade e na biodisponibilidade dos fármacos, na interacção com outros compostos e na possibilidade de diminuir possíveis efeitos secundários indesejáveis. Fármacos muito hidrossolúveis tendem a dissolver-se rapidamente, sendo a difusão passiva e/ou o transporte activo do composto o passo limitante da absorção. Contrariamente, a velocidade de absorção de fármacos lipossolúveis vai ser limitada pela sua velocidade de dissolução em meio aquoso, estando a difusão passiva destes compostos estreitamente relacionada com a respectiva afinidade que apresentam para os lípidos constituintes das biomembranas. Esta afinidade é, em geral, quantificada pelo seu coeficiente de partição.

Estruturas organizadas, como micelas e lipossomas tem a capacidade de simular muitas das propriedades das membranas celulares, constituindo modelos estruturais simples para o estudo da interacção de moléculas farma-

cológicamente activas com as biomembranas, e respectivas consequências sobre o seu mecanismo de acção. Para além disso, a sua preparação, caracterização e manuseamento é mais fácil e reprodutível do que a utilização de células ou tecidos animais.

Para além da sua utilização como modelos celulares, diversas outras aplicações têm sido encontradas para as estruturas aqui caracterizadas. A capacidade que as micelas apresentam para dissolver as mais variadas substâncias têm importantes e aplicáveis implicações a nível biológico e farmacêutico. Os detergentes naturais, como os sais biliares, fosfolípidos e glicosídeos esteróis, são importantes componentes de estruturas biológicas e apresentam papéis fundamentais a nível da absorção e transporte de substâncias exógenas (Pramauro e Pelizzetti, 1996). Nomeadamente, os sais biliares são capazes de facilitar a absorção de determinados nutrientes, bem como de fármacos, por alterarem a sua solubilidade e por interagirem com as membranas biológicas, fluidificando a sua estrutura e modificando a sua permeabilidade (Moutinho, 2000).

A adição de agentes tensioactivos, de origem natural ou sintética, a fórmulas farmacêuticas administradas por via oral têm evidenciado alguma acção na biodisponibilidade e características farmacocinéticas dos fármacos. Na presença destes adjuvantes, o incremento, bem como a diminuição da absorção e da actividade farmacológica podem ser observados. Os principais efeitos destas estruturas na biodisponibilidade dos fármacos situam-se a nível da sua solubilidade, da velocidade de esvaziamento gástrico e da alteração da permeabilidade das membranas (Gibaldi e Feldman, 1970). De facto, o passo limitante na absorção de fármacos muito lipossolúveis é a sua solubilidade nos fluídos do tracto gastrointestinal, que é facilitada pela presença de micelas. Fármacos muito hidrossolúveis tendem a dissolver-se rapidamente, mas a difusão através da membrana é limitada, sendo adjuvada pela presença das micelas. A acção destas estruturas na alteração do trânsito gastro-intestinal pode ter um efeito facilitador da absorção para substâncias que, como exemplo, sejam sensíveis ao pH estomacal (Gibaldi e Feldman, 1970), ou dificultar a absorção de fármacos que sejam absorvidos mais lentamente.

Os lipossomas constituem também interessantes vectores para fármacos, pois podem promover a manutenção da sua concentração plasmática, aumentando a biodisponibilidade e diminuindo os efeitos tóxicos do fármaco. Podem ainda aumentar a solubilização de fármacos lipossolúveis, veicular as substâncias que transportam para determinadas células-alvo ou proteger os fármacos de enzimas degradativas (Lasic, 1993).

Um campo de estudo em que micelas e vesículas têm apresentado um crescente interesse é a análise química. Estas estruturas apresentam a capacidade de solubilizarem, concentrarem e compartimentarem espécies químicas, alterarem as suas propriedades espectroscópicas, alterarem constantes de dissociação, oxidação ou redução e comporem um meio reaccional onde a velocidade e o mecanismo das reacções químicas pode encontrar-se modi-

98 ficado (Pramauro e Pelizzetti, 1996). Por essas razões, técnicas analíticas que englobam o uso destas estruturas têm vindo a ser desenvolvidas, em que as micelas são usadas para aumentar a sensibilidade das metodologias analíticas ou modificar as condições reaccionais (Chen *et al.*, 1994; Medina-Hernández e Sagrado, 1995). São usadas em técnicas espectroscópicas, pois podem alterar ou evidenciar as propriedades espectroscópicas de determinados solutos, em técnicas electroanalíticas, como potenciometria ou voltametria e ainda em técnicas cromatográficas (Pramauro e Pelizzetti, 1996).

O conjunto crescente de interessantes resultados e conclusões que têm vindo, ao longo dos anos, a ser desenvolvidos e publicados, incrementa o renovado interesse nas estruturas organizadas mencionadas. Paralelamente, novos e vantajosos campos de aplicação destas estruturas têm vindo a ser revelados, aumentando a amplitude das metodologias analíticas baseadas nestes sistemas, que requerem o conhecimento aprofundado das suas características estruturais e físico-químicas e da sua interacção com moléculas bioactivas.

■ BIBLIOGRAFIA

- Acquier, R., Maillols, H., Delonca, H. (1983). Les caractères physico-chimiques des principes actifs et leur constante de vitesse de dissolution *in vitro*. *In: J. Pharm. Belg.* 38 (4) 219-225.
- Alcorn, C. J., Simpson, R. J., Leahy, D. E., Peters, T. J. (1993). Partition and distribution coefficients of solutes and drugs in brush border membrane vesicles. *In: Biochem. Pharmacol.* 45 (9) 1775-1782.
- Austin, R. P., Barton, P., Davis, A. M., Manners, C. N. (1995). Partitioning of Ionizing Molecules between Aqueous Buffers and Phospholipid Vesicles. *In: J. Pharm. Sci.* 84 (10) 1180-1183.
- Avdeef, A., Box, K. J., Comer, J. E. A., Hibbert, C., Tam, K. Y. (1998). PH-Metric log P. Determination of Liposomal Membrane-Water Partition Coefficients of Ionizable Drugs. *In: Pharm. Res.* 15 (2) 209-215.
- Basak, S. C., Harriss, D. K., Magnuson, V. R. (1984). Comparative Study of Lipophilicity versus Topological Molecular Descriptors in Biological Correlations. *In: J. Pharm. Sci.* 73 (4) 429-437.
- Betageri, G. V., Rogers, J. A. (1988). The liposome as a distribution model in QSAR studies. *In: Int. J. Pharm.* 46, 95-102.
- Betageri, G. V., Rogers, J. A. (1989). Correlation of Partitioning of Nitroimidazoles in the *n*-Octanol/Saline and Liposome Systems with Pharmacokinetic Parameters and Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR). *In: Pharm. Res.* 6 (5) 399-403.
- Cevc, G. (1990). Membrane electrostatics. *In: Biochim. Biophys. Acta* 1131-3, 311-382.
- Chen, N., Zhang, Y., Terabe, S., Nakagawa, T. (1994). Effect of physico-chemical properties and molecular structure on the micelle-water partition coefficient in micellar electrokinetic chromatography. *In: J. Chromatogr. A* 678, 327-332.
- Choi, Y. W., Rogers, J. A. (1990). The Liposome as a Model Membrane in Correlations of Partitioning with α -Adrenoceptor Agonist Activities. *In: Pharm. Res.* 7 (5) 508-512.
- Cooper, E. R., Berner, B., Bruce, R. D. (1981). Kinetic analysis of relationship between partition coefficient and biological response. *In: J. Pharm. Sci.* 70 (1) 57-59.
- Cornell, B. A., Middlehurst, J., Separovic, F. (1980). The molecular packing and stability within highly curved phospholipid bilayers. *In: Biochim. Biophys. Acta* 598 (2) 405-410.

- De Young, L. R., Dill, K. A. (1988). Solute Partitioning into Lipid Bilayer Membranes. *In: Biochemistry* 27, 5281-5289.
- Dean, J. R., Tomlinson, W. R., Makovskaya, V., Cumming, R., Hetheridge, M., Comber, M. (1996). Solid-Phase Microextraction as a Method for Estimating the Octanol-Water Partition Coefficient. *In: Anal. Chem.* 68, 130-133.
- Diamond, J. M., Katz, Y. (1974). Interpretation of Nonelectrolytes Partition Coefficients between Dimyristoyl Lecithin and Water. *In: J. Membrane Biol.* 17, 121-154.
- Fendler, J. H. (1982). *Membrane Mimetic Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- García, M. A., Marina, M. L. (1994). Study of the k' or $\log k' - \log P_{OW}$ correlation for a group of benzene derivatives and polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar liquid chromatography with a C_8 column. *In: J. Chromatography A* 687, 233-239.
- Garcia, M. E. D., Sanz-Medel A. (1986). Dye-surfactant interactions: a review. *In: Talanta* 33 (3) 255-264.
- Gibaldi, M., Feldman, S. (1970). Mechanisms of Surfactant Effects on Drug Absorption. *In: J. Pharm. Sci.* 59 (5) 579-589.
- Gier, J. (1987). The use of liposomes in the search for an understanding of the significance of membrane lipid diversity. In, *Liposomes: From Membrane Model to Therapeutic Applications*. *In: Biochem. Soc. Trans.* 16, 912-914.
- Gobas, F. A. P. C., Lahittete, J. M., Garofalo, G., Shiu, W. Y. (1988). A Novel Method for Measuring Membrane-Water Partition Coefficients of Hydrophobic Organic Chemicals: Comparison with 1-Octanol-Water Partitioning. *In: J. Pharm. Sci.* 77 (3) 265-272.
- Grieser, F., Drummond, C. J. (1988). The physicochemical Properties of Self-Assembled Surfactant Aggregates As Determined by Some Molecular Spectroscopic Probe Techniques. *In: J. Phys. Chem.* 92, 5580-5591.
- Grit, M., Crommelin, D. J. A. (1992). The effect of aging on the physical stability of liposome dispersions. *In: Chem. Phys. Lipids* 62, 113-122.
- Grit, M., Crommelin, D. J. A. (1993). Chemical stability of liposomes: implications for their physical stability. *In: Chem. Phys. Lipids* 64, 3-19.
- Grit, M., Smidt, J. H., Struijke, A., Crommelin, D. J. A. (1989). Hydrolysis of phosphatidylcholine in aqueous liposome dispersions. *In: Int. J. Pharm.* 50, 1-6.
- Grit, M., Zuidam, N. J., Underberg, W. J. M., Crommelin, D. J. A. (1993a). Hydrolysis of Partially Saturated Egg Phosphatidylcholine in Aqueous Liposome Dispersions and the Effect of Cholesterol Incorporation on Hydrolysis Kinetics. *In: J. Pharm. Pharmacol.* 45, 490-495.
- Grit, M., Underberg, W. J. M., Crommelin, D. J. A. (1993b). Hydrolysis of Saturated Soybean Phosphatidylcholine in Aqueous Liposome Dispersions. *In: J. Pharm. Sci.* 82 (4) 362-366.
- Hansch, C., Clayton, J. M. (1973). Lipophilic Character and Biological Activity of Drugs II: The Parabolic Case. *In: J. Pharm. Sci.* 62 (1) 1-21.
- Hansch, C., Dunn, III W. J. (1972). Linear Relationships between Lipophilic Character and Biological Activity of Drugs. *In: J. Pharm. Sci.* 61 (1) 1-19.
- Hansch, C., Fujita, T. (1964). $\rho - \sigma - \pi$ Analysis. A Method for the Correlation of Biological Activity and Chemical Structure. *In: J. Am. Chem. Soc.* 86, 1616.
- Herbert, B. J., Dorsey, J. G. (1995). *N*-Octanol-Water Partition Coefficient Estimation by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography. *In: Anal. Chem.* 67, 744-749.
- Herbette, L. G., Mason, P. E., Gaviraghi, G., Tulenko, T. N., Mason, R. P. (1994). The Molecular Basis for Lacidipine's Unique Pharmacokinetics: Optimal Hydrophobicity Results in Membrane Interactions That May Facilitate the Treatment of Atherosclerosis. *In: J. Cardiovasc. Pharmacol.* 23 (Suppl. 5) S16-S25.
- Hope, M. J., Bally, M. B., Mayer, L. D., Janoff, A. S., Cullis, P. R. (1986). Generation of multilamellar and unilamellar phospholipid vesicles. *In: Chem. Phys. Lipids* 40, 89-107.

- Houston, J. B., Upshall, D. G., Bridges, J. W. (1974). A re-evaluation of the importance of partition coefficients in the gastrointestinal absorption of nutrients. *In: J. Pharm. Exp. Ther.* 189 (1) 244-254.
- Houston, J. B., Upshall, D. G., Bridges, J. W. (1975). Further studies using carbamate esters as model compounds to investigate the role of lipophilicity in the gastrointestinal absorption of foreign compounds. *In: J. Pharm. Exp. Ther.* 195 (1) 67-72.
- Huang, C., Mason, J. T. (1978). Geometric packing constraints in egg phosphatidylcholine vesicles. *In: Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1) 308-310.
- Hubbell, W. L., McConnell, H. M. (1971). Molecular motion in spin-labeled phospholipids and membranes. *In: J. Am. Chem. Soc.* 93 (2) 14-26.
- Jones, M. N., Chapman, D. (1995). Micelles, monolayers and biomembranes. Wiley-Liss Inc., New York.
- Katz, Y., Diamond, J. M. (1974a). A Method for Measuring Nonelectrolytes Partition Coefficients between Liposomes and Water. *In: J. Membrane Biol.* 17, 69-86.
- Katz, Y., Diamond, J. M. (1974b). Thermodynamic Constants for Nonelectrolytes Partition Coefficients between Dimyristoyl Lecithin and Water. *In: J. Membrane Biol.* 17, 101-120.
- Knaub, S. R., Chang M. F., Lunte C. E., Topp E. M., Riley C. M. (1995). Automated analytical systems for drug development studies. Part IV. A microdialysis system to study the partitioning of lomefloxacin across an erythrocyte membrane in vitro. *In: J. Pharm. Biomed. Anal.* 14, 121-129.
- Korolkovas, A., Burckhalter, J. H. (1988). Química Farmacêutica. Editora Guanabara. Rio de Janeiro.
- Krämer, S. D., Jakits-Deiser, C., Wunderli-Allenspach, H. (1997). Free Fatty Acids Cause pH-Dependent Changes in Drug-Lipid Membrane Interactions around Physiological pH. *In: Pharm. Res.* 14 (6) 827-832.
- Kubinyi, H. (1979). Nonlinear dependence of biological activity on hydrophobic character: the bilinear model. *In: Il Farmaco* 34 (3) 248-276.
- Lalor, C. B., Flynn, G. L., Weiner, N. (1994). Formulation Factors Affecting Release of Drug from Topical Vehicles. I. Effect of Emulsion Type upon *in Vitro* Delivery of *n*-Alkyl *p*-Aminobenzoate. *In: J. Pharm. Sci.* 84 (11) 1525-1528.
- Lalor, C. B., Flynn, G. L., Weiner, N. (1995). Formulation Factors Affecting Release of Drug from Topical Vehicles. II. Effect of Solubility on *in Vitro* Delivery of a Series of *n*-Alkyl *p*-Aminobenzoates. *In: J. Pharm. Sci.* 84 (6) 673-676.
- Lasic, D. D. (1993). Liposomes-from Physics to Applications. Elsevier, Amsterdam.
- Lázníček, M., Lázníčková, A. (1995). The effect of lipophilicity on the protein binding and blood cell uptake of some acidic drugs. *In: J. Pharm. Biomed. Anal.* 13, 823-828.
- Leo, A., Hansch, C., Elkins, D. (1971). Partition coefficients and their uses. *In: Chem. Rev.* 71 (6) 525-552.
- Lopes, A. M. G. (1997). Partição de Xenobióticos Orgânicos em Agregados Anfílicos. Uma Proposta de Novos Previsores de Bioconcentração. Dissertação de Doutorado. Instituto de Tecnologia Química e Biológica. Universidade Nova de Lisboa.
- Marqusee, J. A., Dill, K. A. (1986). Solute partitioning into chain molecule interphases: Monolayers, bilayers and micelles. *In: J. Chem. Phys.* 85 (1) 434.
- Martin, Y. C. (1981). A Practitioner's Perspective of the Role of Quantitative Structure-Activity Analysis in Medicinal Chemistry. *In: J. Med. Chem.* 24 (3) 229-237.
- Matos, C. M. S. (2001). Interação de fármacos com lipossomas. Efeitos nas propriedades físico-químicas. Dissertação de Doutorado. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.
- Medina-Hernández, M. J., Sagrado, S. (1995). Chromatographic quantification of hydrophobicity using micellar mobile phases. *In: J. Chromatogr. A* 718, 273-282.

- Mouritsen, O. G., Jørgensen, K. (1998). A New Look at Lipid-Membrane Structure in Relation to Drug Research. *In: Pharm. Res.* 15 (10) 1507-1519.
- Moutinho, C. M. S. G. (2000) Interações de espécies moléculares com sistemas anfílicos organizados. Relação da estrutura e propriedades físico-químicas na partição de bloqueadores- β e de benzodiazepinas em meios micelares. Dissertação de Doutoramento. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.
- New, R. R. C. (1990). Liposomes-a practical approach. Rickwood D., Hames B. D., Eds. IRL Press, Oxford.
- Noy, N. (1992). The ionization behavior of retinoic acid in lipid bilayers and in membranes. *In: Biochim. Biophys. Acta* 1106, 159-164.
- Ong, S., Liu, H., Qiu, X., Bhat, G., Pidgeon, C. (1995). Membrane Partition Coefficients Chromatographically Measured Using Immobilized Artificial Membrane Surfaces. *In: Anal. Chem.* 67, 755-762.
- Oswald, W. e Guimarães, S. (2001). Terapêutica Medicamentosa e suas Bases Farmacológicas. 4ª Ed. Porto Editora.
- Pauletti, G. M., Wunderli-Allenspach, H. (1994). Partition coefficients in vitro: artificial membranes as a standardized distribution model. *In: Eur. J. Pharm. Sci.* 1, 273-282.
- Phillips, M. C. (1972). The Physical State of Phospholipids and Cholesterol in Monolayers, Bilayers, and Membranes. *In: Progr. Surf. Membr. Sci.* 5, 139-221.
- Pramauro, E., Pelizzetti, E. (1996). Surfactants in analytical chemistry. Applications of organized amphiphilic media. Elsevier, New York.
- Santos, A. P. L. M. G. (1994). Aplicação de métodos potenciométricos e espectroscópicos ao estudo de interações entre moléculas com relevância biológica mediadas por catiões metálicos. Dissertação de Doutoramento. Departamento de Química. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
- Schanke, L. S. (1959). Absorption of drugs from the rat colon. *In: J. Pharmacol. Exp. Ther.* 126, 283-290.
- Scherrer, R. A., Howard, S. M. (1977). Use of Distribution Coefficients in Quantitative Structure-Activity Relationships. *In: J. Med. Chem.* 20 (1) 53-58.
- Schmidt, D. E., Votaw, J. R., Kessler, R. M., de Paulis, T. (1994). Aromatic and amine substituent effects on the apparent lipophilicities of N-[(2-pyrrolidinyl) methyl]-substituted benzamides. *In: J. Pharm. Sci.* 83 (3) 305-315.
- Seelig, A. (1987). Local anesthetics and pressure: a comparison of dibucaine binding to lipid monolayers and bilayers. *In: Biochim. Biophys. Acta* 899, 196-204.
- Seelig, J., Macdonald, P. M., Scherer, P. G. (1987). Phospholipid Head Groups as Sensors of Electric Charge in Membranes. *In: Biochemistry* 26 (24) 7535-7541.
- Seeman, P., Roth, S., Schneider, H. (1971). The membrane concentrations of alcohol anesthetics. *In: Biochim. Biophys. Acta* 225, 171-184.
- Sudhölter, E. J. R., van de Langkruis G. B., Engberts B. F. N. (1980). Micelles. Structure and catalysis. *In: Journal of the Royal Netherlands Chemical Society* 99 (3) 73-82.
- Takács-Novák, K., Avdeef, A. (1996). Interlaboratory study of log *P* determination by shake-flask and potentiometric methods. *In: J. Pharm. Biomed. Anal.* 14, 1405-1413.
- Tyrrell, D. A., Heath, T. D., Colley, C. M., Ryman, B. E. (1976). New aspects of liposomes. *In: Biochim. Biophys. Acta* 457, 259-302.
- Walter, A., Gutknecht, J. (1986). Permeability of Small Nonelectrolytes through Lipid Bilayer Membranes. *In: J. Membr. Biol.* 90, 207-217.
- Woodle, M. C., Papahadjopoulos, D. (1997). Liposome Preparation and Size Characterization. In, Biomembranes. Ed. Lester Packer e Sidney Fleischer, Academic Press.
- Zuidam, N. J., Crommelin, D. J. A. (1995). Chemical Hydrolysis of Phospholipids. *In: J. Pharm. Sci.* 84 (9) 1113-1118.