

# MOLÉCULAS ANFIFÍLICAS - LÍPIDOS - E FORMAÇÃO DE AGREGADOS SUPRAMOLECULARES: MICELAS E LIPOSSOMAS.

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

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

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

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

## ■ ABSTRACT

The ability for self-organization of amphiphilic molecules (lipids), forming structurally more complex systems, from micelles to liposomes, constitutes the basic foundation for many biological phenomena. Lipids, for presenting important physiological roles, correlated with their particular structure and self-aggregation properties, are an interesting field of research and development. A detailed study of the micellar and membranar environment is fundamental to the knowledge of micelle's and liposome's capacity of acting as solubilization enhancers, what would allow the gathering of valuable information about drug's mechanisms of transportation throw biomembranes. Assessment of the multiple amphiphilic molecule's characteristics, together with the evaluation of the organized structures formed, is of the best interest for the comprehension of certain physiological functions, namely absorption, distribution and dynamics of certain compounds in the human organism.

## ■ RESUMO

A capacidade das moléculas anfifílicas (lípidos) de se auto-organizarem em sistemas estruturalmente mais complexos, desde micelas a bicamadas, constitui um pilar básico de muitos fenómenos biológicos, como a membrana celular, ou a solubilização de compostos lipossolúveis, endógenos ou exógenos. Os lípidos, por apresentarem funções fisiológicas importantes, correlacionáveis com a sua estrutura e com a sua capacidade de auto-agregação, constituem um interessante campo de investigação e desenvolvimento. Um estudo detalhado dos ambientes micelares e membranares é fundamental para o conhecimento da capacidade das micelas e lipossomas actuarem como indutores de solubilização, o que permitirá obter informações valiosas dos mecanismos de transporte de fármacos através das biomembranas. A comparação das propriedades das diversas moléculas anfifílicas, bem como das diferentes estruturas organizadas formadas, é do maior interesse para a compreensão de certas funções fisiológicas, designadamente, a absorção, distribuição e dinâmica de certos compostos no organismo humano.

## I. INTRODUÇÃO

Moléculas anfipáticas ou anfifílicas são moléculas em que entidades químicas possuidoras de afinidade ou repulsa pela água coexistem. Apresentam assim, em áreas moleculares diferenciadas, um grupo polar habitualmente designado por “cabeça” e um grupo apolar designado por “cauda”. Em termos da

sua estrutura química, as moléculas anfipáticas possuem grupos hidrofóbicos alquil, acil ou aromáticos, geralmente uma ou mais cadeias de hidrocarbonetos lineares ou ramificados com mais de 8 grupos metilénicos, em combinação com grupos polares e/ou ionizáveis com carácter hidrofílico (Atwood e Florence, 1983; Jones e Chapman, 1995; Pramauro e Pelizzetti, 1996). É a necessidade de satisfazer estas características antagónicas e minimizar a energia do sistema que origina a junção dos resíduos hidrofóbicos, formando agregados estruturais como micelas, e que leva ao fenómeno interfacial que é a formação de monocamadas, bicamadas e estruturas vesiculares, e ainda à existência da membrana biológica (Jones e Chapman, 1995).

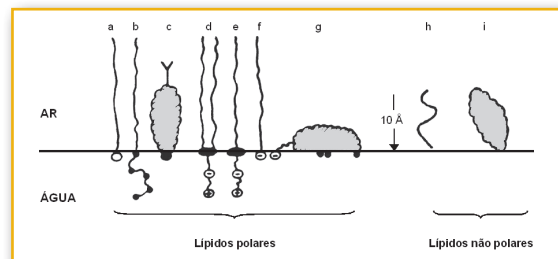
A par desta capacidade de auto-agregação, uma outra característica específica destas moléculas anfílicas é a capacidade de baixarem a tensão superficial da superfície de contacto entre dois meios, sendo por esse facto geralmente denominados agentes tensioactivos ou surfactantes (do anglo-saxónico “surface active agents”). Em presença de excesso de água (ou outro solvente), os compostos anfílicos, numa concentração acima da sua concentração micelar crítica (cmc), auto-agregam-se formando diferentes tipos de estruturas organizadas: micelas, monocamadas, vesículas (lipossomas). Estas estruturas apresentam uma região externa com características idênticas à do solvente e uma região interna de propriedades inversas da anterior. As suas interessantes propriedades estruturais e físico-químicas fomentam o seu interesse em variados campos de aplicação, desde o seu uso como modelos celulares, como solventes em metodologias analíticas, ou ainda como componentes de formulações farmacêuticas, para aumentar a biodisponibilidade de fármacos.

## II. TIPOS DE MOLÉCULAS ANFIPÁTICAS

A carga da “cabeça” das moléculas anfipáticas determina grande parte das suas propriedades físico-químicas, pelo que é base da classificação mais usual dos agentes anfílicos, que se dividem em aniónicos, catiónicos, não iónicos e zwitteriónicos (Atwood e Florence, 1983; Jones e Chapman, 1995; Pramauro e Pelizzetti, 1996). A auto-agregação dos agentes anfílicos em água leva à formação de estruturas que dependem da contribuição relativa das regiões hidrofóbicas e hidrofílicas da molécula. Agentes anfílicos contendo duas cadeias hidrocarbonadas longas tendem a formar bicamadas, enquanto que moléculas com uma só cadeia, ou duas cadeias curtas ( $\leq 8$  C) formam micelas em solução aquosa. Esta capacidade de formar micelas ou bicamadas pode ser genericamente relacionada com a ocupação espacial relativa dos grupos de “cabeça” ou “caudas” das moléculas anfílicas. Assim, quando a molécula de tensioactivo exhibe uma configuração cónica, possuindo uma área de “cabeça” elevada e uma “cauda” única, tende a formar micelas esféricas. Se a área da cabeça diminuir em relação à cauda, o agregado formado assumirá a forma de micelas globulares ou cilíndricas. A existência de duas caudas longas e fluídas leva à formação de vesículas de bicamadas flexíveis, enquanto que moléculas anfílicas com duas cadeias menos fluídas e configuração cilíndrica formam bicamadas planas. Agentes anfílicos com dupla cauda e valores baixos de área por cabeça tendem a formar micelas invertidas (Lopes, 1997).

O termo “lípidos” é um conceito geral que compreende um grupo heterogêneo de compostos orgânicos, cujas moléculas possuem um componente volumoso, de natureza aromática ou alifática, que pode estar, ou não, associado a um grupo solúvel em solução aquosa. A porção da molécula solúvel em água é denominada por grupo ou cabeça polar, ou ainda, por grupo hidrofílico, em oposição com o grupo hidrofóbico da parte da molécula insolúvel no meio aquoso (Ayd, 1997; Carey e Small, 1970; Carey e Small, 1972; Helenius e Simons, 1975). Os lípidos polares constituem o principal grupo de lípidos biologicamente importantes no ser humano (Helenius e Simons, 1975). Na Figura 1 representa-se alguns exemplos de lípidos anfifílicos (de **a** a **g**) orientados nas interfaces ar/água ou óleo/água. As moléculas de lípidos caracterizadas por **h** e **i** não possuem parte hidrofílica e, por esta razão, permanecem no exterior da fase aquosa. São os chamados lípidos não polares. Os lípidos polares possuem um comportamento muito variado à superfície e no interior da água, comportamento esse que depende da força relativa das porções hidrofóbica e hidrofílica da molécula, ou do seu equilíbrio hidrófilo-lipófilo, E.H.L.. O conceito de E.H.L., preconizado por Griffin em 1948, baseia-se, como aliás já era anteriormente admitido, no reconhecimento de que todas as substâncias tensoactivas são constituídas por uma parte hidrossolúvel e outra lipossolúvel, dependendo a sua solubilidade final da proporção em que elas estão associadas numa mesma molécula (Helenius e Simons, 1975; Prista, 1991). A originalidade do sistema de Griffin reside, contudo, em traduzir as propriedades hidrófila e lipófila em termos de uma escala numérica, segundo a qual são atribuídas às substâncias tensoactivas valores de E.H.L. compreendidos entre 1 e 50, aumentando à medida que a substância se torna mais hidrófila. Deste modo, a noção um tanto vaga que precedentemente andava associada à hidro e à lipossolubilidade de um determinado composto passou a ser substituída por um critério mais objectivo e preciso, no qual cada composto é representado por um número que automaticamente o inclui num determinado grupo. De facto, as substâncias com um E.H.L. muito baixo ( $\approx 2$ ), portanto acentuadamente lipófilas, são agentes anti-espuma. Pelo contrário, as substâncias que possuem um E.H.L. compreendido entre 16 e 18 são consideradas agentes solubilizantes. Se a porção hidrofílica de um lípido polar é mais forte que a apolar, a molécula propende para ser solúvel em solução aquosa. Contrariamente, se o E.H.L. se se aproxima do lado hidrofóbico da escala de Griffin, a molécula tende a ser insolúvel em água (Carey e Small, 1970).

**Fig. 1.** Representação esquemática de algumas moléculas lipídicas típicas na interface ar/água: a) configuração geral de uma molécula anfifílica alifática; b) detergente neutro de cadeia longa; os círculos fechados representam a multiplicidade de grupos polihidroxilos ou poli-éteres c) colesterol; d) lecitina; e) lisolecitina; f) ácido gordo ionizado ou detergente aniónico; g) sal biliar; h) lípido alifático não polar como n-octadeno; i) lípido aromático não polar como colestano. O - grupos polares de moléculas anfifílicas; • - grupos OH<sup>-</sup> ou éster; ⊕ e ⊙ - grupo iónico carregado positiva e negativamente, respectivamente. Adaptado de Carey e Small, 1970.



A maior parte dos lípidos polares é solúvel à superfície da água formando assim, uma camada monomolecular que depende da concentração, solubili-

dade global e das propriedades intrínsecas da molécula utilizada. Contudo, diferentes tipos de lípidos polares possuem variadas interações com a água e deste modo, formam diferentes monocamadas. O balanço relativo entre os meios hidrófilo e hidrofóbico dos vários lípidos polares é, como já foi mencionado, reflectido nos seus comportamentos em solução aquosa e fornece a base para a suas classificações. Na Tabela 1 apresenta-se a classificação dos lípidos biologicamente activos, de acordo com as suas interações que desenvolvem no interior ou à superfície da água.

Classe	Características	À superfície	No interior	Exemplos
<b>Lípidos não polares</b>	• Insolúveis	Filme lipídico	Insolúveis	- hidrocarbonetos - ácidos gordos (ag)
<b>Lípidos polares: anfífilicos I</b>	• Insolúveis • Não intumescem	MC <sup>b</sup> ) estável	Insolúveis	- tri-diacilglicerídeos - colesterol - vitaminas: A,D,E,K - ag protonados
<b>anfífilicos II</b>	• Insolúveis • Intumescem	MC <sup>b</sup> ) estável	Cristais líquidos puros (bicamadas)	- fosfolípidos - mono-acilglicerid. - hidroxi ag
<b>anfífilicos III. A</b>	• Insolúveis • Com ML <sup>a</sup> )	MC <sup>b</sup> ) instável	• Micelas <sup>c</sup> ) • Cristais líquidos	- detergentes - lisolecitina - sais N <sup>+</sup> e K <sup>+</sup> de a de cadeia longa
<b>anfífilicos III. B</b>	• Insolúveis • Sem ML <sup>a</sup> )	MC <sup>b</sup> ) instável	Micelas <sup>c</sup> )	- sais biliares - saponinas

a) ML - Mesomorfismo liotrópico; b)MC - Monocamada; c) Para concentrações de composto anfífilico superiores à sua cmc.

**Tab.1.** Classificação operacional dos lípidos de acordo com os seus comportamentos em solução aquosa (Carey e Small, 1970; Helenius e Simons, 1975).

Os lípidos polares da classe II são insolúveis em solução aquosa, mas a água é, no entanto, “solúvel” neles. De facto, as moléculas de água penetram entre os grupos polares destes lípidos, desde que as suas cadeias hidrocarbonadas estejam no estado líquido, originando uma estrutura lipídica intumescida que consiste, geralmente, em bicamadas lipídicas que alternam com camadas de água. Esta fase composta por cristais líquidos lamelares, pode conter cerca de 45% de água (Mazer *et al.*, 1984). Na presença de maiores proporções de água, os cristais líquidos separam-se do excesso de água, originando uma segunda fase, que é reconhecida ao microscópio, como figuras de mielina típicas e de gotas anisotrópicas (Small, 1968; Small, 1975; Paula *et al.*, 1995). A formação de uma fase cristalina líquida em solução aquosa é designada por mesomorfismo liotrópico, porque ocorre uma alteração do estado físico quando o solvente é adicionado e, portanto, quando a concentração do composto anfífilico varia (Jones e Chapman, 1995; Lasic, 1993). Pela análise da Tabela 1 pode verificar-se que os lípidos solúveis podem ser divididos em dois grupos: os do tipo A e os do tipo B. A classe III. A incluiu todos os lípidos anfífilicos capazes de formar, em concentrações elevadas, cristais líquidos, nomeadamente, cúbicos, hexagonais e lamelares, exibindo, desta forma, um mesomorfismo liotrópico. Os lípidos da classe III. B possuem, usualmente, regiões hidrofóbicas de origem cíclica ou aromática e, presumivelmente, por esta razão não manifestam qualquer mesomorfismo

liotrópico. Os lípidos pertencentes à classe III são os únicos que possuem a capacidade de formar micelas e de, adicionalmente, solubilizar e transportar outros lípidos, quer sejam apolares, quer polares. Embora ainda não tenha sido claramente demonstrado, pensa-se que certos peptídeos biológicos podem comportar-se como os lípidos da classe III, sendo assim, responsáveis pela solubilização de lípidos insolúveis das lipoproteínas de alta densidade.

### II.I. LÍPIDOS ANFIFÍLICOS SOLÚVEIS

Os lípidos anfifílicos solúveis (classes III. A e III. B) são frequentemente, denominados como “colóides de associação” (Small, 1968; Small, 1975). Os colóides, conceito inicialmente introduzido por Thomas Graham em 1861, são tradicionalmente divididos em três classes, dependendo da facilidade com que o sistema pode ser disperso (Prista, 1991). Assim, é comum falar-se em colóides hidrofílicos, lipofílicos e anfifílicos. Estes últimos englobam os compostos que são sempre, ou razoavelmente, solúveis em qualquer solvente utilizado, possuindo ao nível macroscópico, uma aparência homogênea e, por esta mesma razão, são designados como soluções (Pramauro e Pelizzetti, 1981).

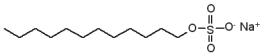
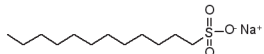
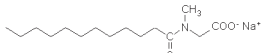
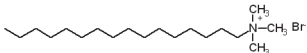

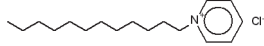
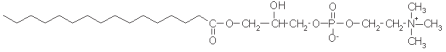
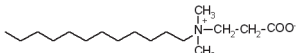
Habitualmente as substâncias anfifílicas apresentam áreas moleculares diferenciadas, ligadas covalentemente e com solubilidades diametralmente opostas. Atendendo à carga do grupo polar, a substância anfifílica pode ser classificada como aniónica, catiónica, neutra ou anfotérica (também designada como zwitteriónica). É universalmente aceite que, por razões estruturais e de natureza química, os compostos anfifílicos apresentam, quando em solução aquosa, características surpreendentes e marcadamente diferentes das restantes dispersões coloidais. Na verdade, as moléculas dos compostos anfifílicos possuem a capacidade de se adsorverem fortemente na interface entre meios homogêneos, diminuindo de modo apreciável a tensão superficial entre os dois meios em contacto (Pramauro E., Pelizzetti, 1996). Por este facto, são vulgarmente designados como agentes tensioactivos. Por outro lado, os meios anfifílicos apresentam a capacidade de auto-agregação com orientação preferencial, originando uma região externa de características idênticas às do solvente maioritário e uma região interna com propriedades inversas da anterior.

Baseado na solubilidade dos monómeros livres, geralmente na ordem de  $10^{-2}$  -  $10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>, as moléculas dos compostos anfifílicos podem ser consideradas como mediamente solúveis em água (Lopes, 1997). A concentração correspondente à solubilidade de um composto anfifílico em solução aquosa é comumente designada por concentração micelar crítica, cmc, e é função das condições experimentais usadas, designadamente, do valor de pH da solução, da força iónica, da concentração de compostos não-electrólitos, da temperatura e da pressão (Pramauro e Pelizzetti, 1996).

### II.I.I. DETERGENTES IÓNICOS SINTÉTICOS

As soluções micelares de detergentes iónicos sintéticos têm uma importante aplicação em diferentes áreas da Química, principalmente nos fenómenos

de interacção e de distribuição de solutos, e da Tecnologia, como agentes de limpeza, dispersantes e estabilizantes. Por possuírem propriedades comuns com as estruturas biológicas são, também, amplamente utilizadas quando se pretende mimetizar modelos naturais (Jones e Chapman, 1995). São considerados como sistemas bem caracterizados e versáteis, de fácil manuseamento e possuidores de uma grande estabilidade. Possuem duas regiões, a hidrófila, solúvel em solução aquosa e a apolar, constituída pelo núcleo, pelo que tornam simples o cálculo da partição de solutos entre duas fases (Love *et al.*, 1984). A porção hidrofóbica é, usualmente, de natureza alifática ou arilalifática, como pode ser constatado pela análise da Tabela 2, onde se exibem as estruturas de alguns dos detergentes iónicos mais comuns da classe III. A parte apolar é, de facto, geralmente constituída por uma cadeia hidrocarbonada, cujo comprimento pode variar entre 8 a 18 átomos de carbono.

Estrutura química	Nome químico
<b>I – Detergentes aniónicos</b>	
	Dodecil sulfato de sódio (SDS)
	Dodecil sulfonato de sódio
	Dodecil-N-sarcosinato de sódio
<b>II – Detergentes catiónicos</b>	
	Brometo de cetiltrimetil amónio
	Brometo de tetradecil amónio
	Cloreto de dodecil piridínio
<b>III – Detergentes zwiteriónicos</b>	
	Palmitoil de lisolecitina
	Dodecil-N-betaina

Tab. 2. Exemplos de alguns detergentes do tipo A, classe III.

As micelas de um detergente iónico sintético encontram-se em equilíbrio dinâmico com os monómeros que lhe deram origem e são o resultado de três forças principais, nomeadamente, as forças de repulsão hidrofóbica entre as cadeias hidrocarbonadas e o meio aquoso, as forças de repulsão entre os grupos iónicos carregados e, por fim, as forças de atracção de van der Waals entre as cadeias alcilo (Love *et al.*, 1984). Nos detergentes iónicos sintéticos,

o valor da cmc, o tamanho e a estrutura da micela estão dependentes do comprimento da sua cadeia hidrocarbonada, do tamanho e da estrutura do grupo hidrófilo e das possíveis interacções com o solvente.

### II.I.II. SAIS BILIARES

Biologicamente, os sais biliares são os produtos finais do metabolismo do colesterol (Atwood e Florence, 1983). Sintetizados no fígado e no intestino, fazem, posteriormente, parte integrante da composição da bile, actuando como factores determinantes da sua estrutura e volume (Paumgartner *et al.*, 1991). No processo de secreção dos sais biliares, cerca de um décimo do colesterol total é eliminado na bile. Não se conhece qualquer função específica para o colesterol presente na bile e supõe-se que ele representa tão somente um co-produto da formação e secreção dos sais biliares (Street e Trafford, 1983). A bile secretada continuamente pelas células hepáticas é armazenada na vesícula biliar até que se torne necessária a nível duodenal. Este processo é, principalmente, controlado por algumas hormonas gastrintestinais. O volume máximo da vesícula biliar é de apenas 20 a 60 cm<sup>3</sup>. Todavia, esta pode armazenar a secreção biliar correspondente a 12 horas (em geral 450 cm<sup>3</sup>), visto que a água, o sódio, o cloreto e a maioria dos outros electrólitos são, continuamente, absorvidos pela mucosa do epitélio vesicular, concentrando os outros constituintes, designadamente, os sais biliares, o colesterol, a lecitina e a bilirrubina (Guyton, 2003). A Tabela 3 fornece as diferenças quantitativas da composição da bile quando esta é inicialmente secretada pelo fígado e após ter sido concentrada na vesícula biliar. Os sais biliares são responsáveis por cerca de metade dos solutos totais da bile. No entanto, pode verificar-se que a bilirrubina, o colesterol, a lecitina e os electrólitos comuns do plasma são igualmente secretados ou excretados em grandes concentrações.

	Bile hepática	Bile vesicular
Água	97,5 g/100 cm <sup>3</sup>	92 g/100 cm <sup>3</sup>
Sais biliares	1,1 g/100 cm <sup>3</sup>	6 g/100 cm <sup>3</sup>
Bilirrubina	0,04 g/100 cm <sup>3</sup>	0,3 g/100 cm <sup>3</sup>
Colesterol	0,1 g/100 cm <sup>3</sup>	0,3 a 0,9 g/100 cm <sup>3</sup>
Ácidos gordos	0,12 g/100 cm <sup>3</sup>	0,3 a 1,2 g/100 cm <sup>3</sup>
Lecitina	0,04 g/100 cm <sup>3</sup>	0,3 g/100 cm <sup>3</sup>
Na <sup>+</sup>	145 mEq/dm <sup>3</sup>	130 mEq/dm <sup>3</sup>
K <sup>+</sup>	5 mEq/dm <sup>3</sup>	12 mEq/dm <sup>3</sup>
Ca <sup>2+</sup>	5 mEq/dm <sup>3</sup>	23 mEq/dm <sup>3</sup>
Cl <sup>-</sup>	100 mEq/dm <sup>3</sup>	23 mEq/dm <sup>3</sup>
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	28 mEq/dm <sup>3</sup>	10 mEq/dm <sup>3</sup>

Tab. 3. Composição da bile hepática e vesicular (Guyton, 2003).

O colesterol, precursor dos sais biliares, fornecido na dieta ou sintetizado nas células hepáticas durante o metabolismo das gorduras, é convertido em ácido cólico ou ácido quenodesoxicólico, em quantidades aproximadamente

28 iguais. Subsequentemente, estes ácidos combinam-se principalmente com a glicina e, em menor grau, com a taurina, formando os ácidos biliares glico e tauroconjugados. Os sais sódicos e potássicos desses ácidos primários são posteriormente secretados na bile (Fox, 1996; Nook *et al.*, 1987). No cólon intestinal, e sob acção bacteriana, os ácidos cólico e quenodesoxicólico são convertidos a ácidos desoxicólico e litocólico, respectivamente, formando-se, desta forma, os ácidos biliares secundários (Ganong, 1999; Nook *et al.*, 1987; Paumgartner *et al.*, 1991). Os sais biliares conjugados são absorvidos activamente na parte distal do intestino delgado, embora também se considere que ocorra absorção destes agentes tensioactivos naturais em outras regiões dos intestinos delgado e grosso, por outros mecanismos diferentes de transporte, designadamente o transporte passivo de difusão iónica e micelar. Uma vez absorvidos, os sais biliares ligam-se às proteínas plasmáticas e retornam ao fígado. Menos de cinco por cento dos sais biliares totais que entram no fígado passam pela via hepática para a circulação sistémica (Ganong, 1999; Vander *et al.*, 2003). Durante a circulação entero-hepática, os sais biliares são retirados do plasma sanguíneo pelos sinusóides venosos para o fígado e, uma vez nos hepatócitos, são re-segregados activamente na bile, sendo posteriormente armazenados na vesícula. Dados os múltiplos ciclos fisiológicos entre o intestino e o fígado efectuados durante a circulação entero-hepática (cerca de 18 vezes antes de serem eliminados), somente uma quantidade relativamente pequena de ácidos biliares é sintetizada de novo, repondo a que não sofre absorção e é excretada pelo organismo pelas fezes. Assim, o conteúdo do organismo humano em sais biliares é mantido praticamente constante, em condições fisiológicas normais (Clas, 1991; Gouin, 1998; Vander *et al.*, 2003). A quantidade de bile secretada diariamente pelo fígado depende, em grande parte, da concentração dos sais biliares disponíveis. Efectivamente, quanto maior for a quantidade de sais biliares em circulação (em geral cerca de 2,5 g), maior será a velocidade da secreção biliar. Se uma fistula biliar lançar os sais biliares para o exterior durante vários dias, impedindo a sua reabsorção ao nível do íleo, o fígado aumenta até dez vezes a síntese de ácidos biliares, o que incrementa a velocidade de secreção biliar até, aproximadamente, o seu valor normal. Este facto demonstra que a velocidade diária de secreção de sais biliares é activamente controlada pela disponibilidade (ou falta de disponibilidade) destes compostos na circulação entero-hepática.

Estruturalmente, os ácidos biliares são derivados esteróides dos triterpenos tetracíclicos, possuindo um núcleo ciclopentanoperidrofenantreno, com grupos hidroxílicos nos carbonos 3 e 7, 3 e 12 ou 3, 7 e 12, como está representado na Figura 2. O grupo ciclopentanoperidrofenantreno é de natureza alicíclica constituído por três anéis hexagonais com disposição fenantrénica, designados por A, B e C, e por um pentagonal, o anel D (Fattal, 1995; O'Connor, 1982; Reis, 1995). O facto dos ácidos biliares não formarem cristais líquidos e, portanto, não apresentarem mesomorfismo liotrópico, deve-se possivelmente ao carácter globuloso do seu núcleo hidrofóbico.

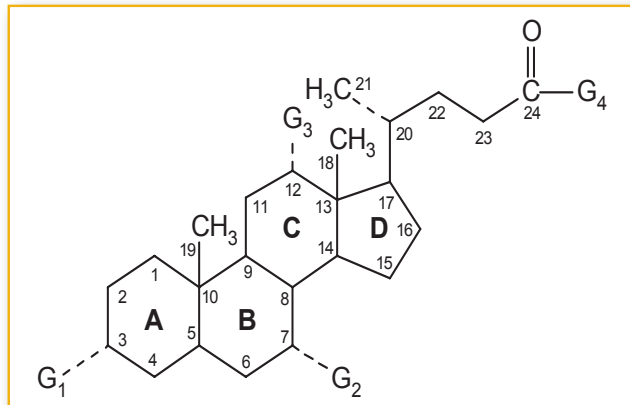


Fig 2. Estrutura química geral da molécula dos ácidos biliares.

Na Tabela 4 apresenta-se os principais ácidos biliares primários e secundários existentes no organismo humano (Ganong, 1999).

Sal biliar	Grupo na Posição:				% na bile
	3 (G <sub>1</sub> )	7 (G <sub>2</sub> )	12 (G <sub>3</sub> )	24 (G <sub>4</sub> )	
Ácido cólico	OH	OH	OH	OH	50
Ácido quenodesoxicólico	OH	OH	H	OH	30
Ácido desoxicólico	OH	H	OH	OH	15
Ácido litocólico	OH	H	H	OH	5
Ácido glicocólico	OH	OH	OH	NH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH	—
Ácido glicokenodesoxicólico	OH	OH	H	NH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH	—
Ácido glicodesoxicólico	OH	H	OH	NH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH	—

Tab. 4. Principais ácidos biliares humanos e a sua percentagem existente na bile.

Os sais biliares exercem nos organismos funções fisiológicas importantes e reconhecidas. De facto, interferem na digestão e absorção dos lípidos e de outras substâncias lipo-solúveis (Atwood e Florence, 1983; Guyton, 2003). Devido ao seu poder detergente, estes agentes tensoactivos naturais têm grande importância na solubilização das lecitinas e do colesterol e, conseqüentemente, auxiliam a eliminação destas duas substâncias endógenas insolúveis.

Os lípidos mais abundantes na dieta são as gorduras neutras, também conhecidas como triglicérides, em que cada molécula é composta por um núcleo de glicerol e três ácidos gordos. Na dieta comum, também existem pequenas quantidades de fosfolípidos, colesterol e ésteres de colesterol (Guyton, 2003). Usualmente, os lípidos, cuja absorção entérica se faz em pequena percentagem, são emulsionados no duodeno pelos sais biliares, e são hidrolisados, parcial ou totalmente, por acção de lipases pancreáticas e entéricas (Uematsu, 1995). Assim, os triacilglicéris transformam-se, numa primeira etapa, em 2-monoacilglicéris e, finalmente, em glicerol e em ácidos gordos. Estes são insolúveis em água, mas prontamente se dispersam em soluções de sais biliares, formando micelas mistas de sais biliares-ácidos gordos-monoacilglicéris. Depois da acção enzimática intra-enterocítica, são lançados no plasma, na forma de lipoproteínas (Fox, 1996; Vander *et al.*, 2003; Gibaldi

**30** e Feldman, 1970). Os sais biliares são, então, responsáveis pelo transporte dos lípidos das fases glóbulo de gordura/solução aquosa para as fases lúmen intestinal/célula epitelial.

A maior parte do colesterol da dieta encontra-se sob a forma de ésteres de colesterol. Tanto estas moléculas, como as dos fosfolípidos são hidrolisadas por lipases existentes na secreção pancreática (Mazer e Carey, 1983). No transporte do colesterol livre e dos produtos restantes das moléculas de fosfolípidos digeridos, as micelas de sais biliares desempenham o mesmo papel de transporte realizado no transporte de monoglicerídeos e de ácidos gordos livres. Com efeito, essa função das micelas é absolutamente essencial para a absorção do colesterol, visto que praticamente nenhum colesterol pode ser absorvido sem a presença das micelas. Pelo contrário, até uma concentração de 60 - 80% os triglicerídeos podem ser digeridos e absorvidos, até mesmo na ausência das micelas de sais biliares (Carey e Small, 1970).

A relação dos sais biliares com a secreção dos lípidos biliares depende das propriedades físicas dos mesmos sais: os mais hidrofóbicos, como o quenodesoxicólico, o desoxicólico e os seus conjugados estimulam a secreção dos lípidos em concentrações menores do que os mais hidrófilos, como o ácido cólico.

Por tudo quanto ficou apontado, torna-se evidente que a comparação das propriedades detergentes dos sais biliares e da sua capacidade de solubilização com as de outros detergentes, e a sua relação com as estruturas moleculares, são de maior interesse para a compreensão da eficiência dos sais biliares nas suas funções biológicas, nomeadamente, na absorção, distribuição e dinamismo de certos compostos no organismo humano.

## **II.II. FOSFOLÍPIDOS**

Os fosfolípidos são os componentes estruturais principais das membranas biológicas. São moléculas anfipáticas (Classe II - ver Tabela 1), derivados do glicerol ou da esfingosina (Atwood e Florence, 1983; Barbosa, 1995; Jones e Chapman, 1995; Lasic, 1993).

Os primeiros são designados por fosfoglicerídeos e consistem numa parte central, constituída por glicerol, a qual une uma parte hidrófila e uma hidrófoba. Por sua vez, os segundos denominam-se esfingomielinas (Barbosa, 1995). A parte hidrófila dos fosfoglicerídeos encontra-se, usualmente, esterificada no terceiro hidroxilo do glicerol e é composta por uma molécula de ácido fosfórico, no caso do ácido fosfatídico, ou então, por um conjunto formado por ácido fosfórico e uma outra molécula hidrossolúvel, esterificados entre si. A molécula hidrossolúvel contém, pelo menos, um grupo hidroxilo, sendo as mais comumente usadas a colina, o inositol, a serina ou a etanolamina. Assim sendo, consoante os respectivos radicais, estes lípidos podem ser a pH fisiológico, electricamente neutros ou apresentarem carga negativa. Por seu turno, a parte hidrofóbica dos fosfoglicerídeos é constituída por uma

ou duas cadeias de ácidos gordos de 12 a 24 átomos de carbono, saturados ou insaturados, que esterificam igual número de grupos hidroxilo do glicerol. São mais comuns os grupos acilos com 16 e 18 átomos de carbono.

Nas esfingomielinas, o grupo amina da esfingosina encontra-se ligado a um ácido gordo, através de uma ligação amida, e o grupo hidroxilo primário está esterificado com a fosforilcolina ou com a fosforiletanolamina. Desta forma, a conformação estrutural das esfingomielinas assemelha-se à da fosfatidilcolina.

Os fosfolípidos são formados em praticamente todas as células do organismo, embora algumas delas tenham maior capacidade de sintetizá-los. Provavelmente 90% são formados nas células hepáticas. Quantidades razoáveis são também sintetizadas pelas células epiteliais do intestino durante a absorção intestinal dos lípidos (Guyton, 2003).

A velocidade de síntese de fosfolípidos é determinada, em parte, pelos factores habituais que controlam a velocidade do metabolismo das gorduras. Além disso, certas substâncias químicas específicas são necessárias para a formação de alguns fosfolípidos. Por exemplo, a colina obtida na dieta ou sintetizada no organismo é necessária para a formação da lecitina, visto ser a colina a base nitrogenada deste lípido. O inositol é também necessário para a formação de alguns fosfolípidos.

Os fosfolípidos desempenham várias funções distintas. Efectivamente, são importantes constituintes das lipoproteínas e, portanto, são essenciais para a formação e função de algumas delas; na sua ausência podem ocorrer graves anormalidades no transporte do colesterol e de outros lípidos. Existem grandes quantidades de esfingomielina no sistema nervoso, que actua como substância isolante nas bainhas da mielina em torno das fibras nervosas. Os fosfolípidos são dadores de radicais fosfato, quando estes são necessários para as diferentes reacções químicas nos tecidos. A tromboplastina, necessária para desencadear o processo de coagulação é composta, principalmente, por estes compostos anfífilos. Contudo, talvez a mais importante de todas as funções dos fosfolípidos seja a participação na formação de elementos estruturais, especialmente das membranas celulares e intracelulares de todos os organismos. A integridade física das células baseia-se, essencialmente, na insolubilidade dos fosfolípidos, do colesterol e de certas proteínas, nos fluídos biológicos. As cargas polares dos fosfolípidos contribuem, também, para a redução da tensão interfacial entre as membranas e os líquidos circundantes (Guyton, 2003).

O fosfolípido mais comum é a fosfatidilcolina (ou lecitina), cuja estrutura se encontra representada na Figura 3, (Atwood e Florence, 1983; Erpecum, 1997). É um produto natural, extraída da gema de ovo ou da semente de soja, que exhibe uma grande heterogeneidade no que diz respeito às cadeias hidrocarbonadas de ácidos gordos esterificantes e à sua insaturação. É, de um ponto de vista eléctrico, um fosfolípido neutro, cujo intervalo de tem-



lipossomas formem dispersões que se incluem, conforme o seu diâmetro, na definição de dispersões coloidais ou de suspensões (Lopes, 1997). As características referidas de auto-agregação e actividade tensioactiva são responsáveis pela formação de interfaces, nas quais as moléculas anfífilas delimitam as zonas ocupadas pelos solventes aquoso e orgânico. Um requisito termodinâmico necessário para a existência de uma interface estável é que a variação da função de Gibbs de formação da interface seja positiva, caso contrário, a interface cresceria espontaneamente, com o resultado que uma das fases se dispersaria na outra. Então, para aumentar a superfície de uma interface é necessário realizar trabalho contra a tensão interfacial. A presença de moléculas anfipáticas faz baixar a tensão interfacial, reduzindo a quantidade de trabalho necessária para aumentar a interface (Jones e Chapman, 1995).

A auto-agregação das moléculas anfífilas para formar as estruturas organizadas é consequência directa do chamado “efeito hidrofóbico”. O contacto energeticamente desfavorável com as moléculas de água força as cadeias hidrocarbonadas a aproximarem-se e organizarem-se. De facto, o contacto de moléculas ou grupos moleculares apolares com a água ordena a primeira camada de moléculas de água à sua volta, formando-se um “iceberg”, onde as moléculas de água adoptam uma estrutura distorcida em relação ao padrão normal de pontes de hidrogénio, levando ao abaixamento da entropia do sistema. A auto-agregação minimiza esta ordenação, observando-se a entropia positiva e a entalpia próxima de zero características do “efeito hidrofóbico” clássico (Pramauro e Pelizzetti, 1996). No entanto, outros efeitos podem ainda concorrer para a formação da estrutura, como efeitos de solvatação, efeitos entrópicos e efeitos electrostáticos. A solvatação devida às moléculas de água em torno dos grupos iónicos das moléculas de detergentes impedem que, para concentrações destes superiores à sua cmc, ocorra precipitação do detergente, maximizando a estabilização dos agregados formados.

Pode estabelecer-se que as moléculas apolares de um detergente são repelidas da fase aquosa e que este efeito é, primeiramente, entrópico (Lopes, 1997). Efectivamente, a introdução de um grupo apolar em solução aquosa, perturba a primeira camada de água à sua volta, tendo, por isso, as moléculas de água de adoptar uma estrutura distorcida, o que provoca um abaixamento entrópico do sistema. Uma vez que não se verifica a diminuição do número de pontes de hidrogénio e que as forças de dispersão entre as moléculas de água e as partes polares dos compostos anfífilos são da ordem de grandeza das que se encontram entre as moléculas de água livre, pode concluir-se que as contribuições da entalpia e das forças de van der Waals para o processo de agregação são pouco significativas. A transferência de uma molécula de detergente da fase aquosa para a micela permite que as moléculas de água recuperem a sua estrutura normal e, desta forma, a entropia aumenta. O efeito electrostático, causado pela presença de um número elevado de grupos iónicos carregados com carga de igual sinal numa região restrita, opõe-se aos efeitos anteriores. Por esta razão, e por o monómero possuir carga, os compostos anfífilos solúveis apresentam uma cmc elevada (Helenius e Simons,

34 1975). Contudo, grande parte dos contra-íões do detergente vai dispor-se numa camada adjacente à interface, diminuindo o seu potencial e, consequentemente, a repulsão electrostática entre os grupos polares ionizados. A fracção de contra-íões que se encontra nessa região define o grau de ligação dos contra-íões,  $\beta$ .

Os monómeros livres de detergente têm a capacidade de se dissolver em água numa concentração aproximada de  $10^{-2}$ - $10^{-4}$  M, formando-se monocamadas de surfactante na interface solvente/ar (Pramauro e Pelizzetti, 1996; Lopes, 1997). A solubilidade referida equivale à cmc, concentração a partir da qual se torna termodinamicamente favorável a formação de agregados. O conceito de cmc é definido apenas para surfactantes capazes de formar micelas, mas o conceito generalizou-se aos outros sistemas, embora os valores de cmc sejam marcadamente diferentes (Pramauro e Pelizzetti, 1996). Para concentrações superiores à respectiva cmc, o excesso de monómeros de um dado composto anfifílico em solução deixa de ser termodinamicamente estável, agregando-se em estruturas dependentes das condições utilizadas e dos parâmetros geométricos. A transição de monómero para agregado pode ser visualizada a partir da variação, mais ou menos súbita, de muitas propriedades fisico-químicas das soluções, como a tensão superficial, a solubilização de compostos hidrofóbicos, a condutividade, a turbidez, a pressão osmótica e a dispersão de luz (Jones e Chapman, 1995). Assim, o termo micela é utilizado para definir um agregado coloidal formado espontaneamente em solução aquosa por compostos com características anfifílicas, a partir de uma certa concentração e acima de uma determinada temperatura. A diferença essencial entre os outros tipos de colóides e os agregados micelares, é que nestes o agregado está em equilíbrio dinâmico e rápido com as moléculas do respectivo monómero.

### III.1. MICELAS:

As micelas são agregados de agentes anfifílicos cujas porções hidrofóbicas se associam para formar regiões das quais o solvente (água) está praticamente excluído. Os grupos polares dispõem-se na superfície por forma a maximizar a sua interacção com a água e com os contra-íões. Uma fracção significativa dos contra-íões mantêm-se ligada aos grupos polares de modo que a força repulsiva lateral entre esses grupos está diminuída. Uma diferença essencial entre as micelas e os outros tipos de agregados é que estas estão em equilíbrio dinâmico rápido com as moléculas do respectivo monómero em solução, na ordem dos milisegundos ou microsegundos (Pramauro e Pelizzetti, 1996). As micelas são estruturas dinâmicas. As suas caudas hidrocarbonadas são relativamente móveis e o interior das micelas apresenta uma microviscosidade de aproximadamente 8 cP. Os grupos polares estão altamente hidratados (Fendlar, 1982). Na Figura 5 está representada, esquematicamente, a estrutura de uma micela de SDS. Considera-se que as micelas de um detergente típico carregado são formadas por um núcleo constituído por  $n$  cadeias hidrocarbonadas com os grupos ionizados direc-

cionados para a água. A camada que envolve o núcleo designa-se por camada Stern e contém, não só, os grupos iónicos do detergente, mas também  $(1-\alpha)n$  contra-íões, cujo grau de ionização  $\alpha$  varia entre 0,5 e 0,8. A região adjacente à camada de Stern, a camada dupla Gouy - Chapman, inclui uma elevada densidade de contra-íões e separa o interior hidrofóbico da micela da fase aquosa (Atwood e Florence, 1983; Pramauro e Pelizzetti, 1996).

Num trabalho de revisão efectuado por Shaw *et al.* sobre os mecanismos de interacção entre certos corantes e as micelas de diversos detergentes ionizados concebeu-se algumas características importantes sobre a estrutura micelar, (Shaw *et al.*, 1991), especificadamente:

- i) O núcleo é virtualmente desprovido de água.
- ii) As cadeias hidrocarbonadas do detergente são casualmente distribuídas, e forças estéricas determinam a estrutura final das micelas.
- iii) O contacto das partes hidrofóbicas da micela com a água conduz à formação duma estrutura, na qual os grupos terminais hidrofílicos das cadeias hidrocarbonadas estão localizados perto da superfície micelar e, desta forma, expostos em contacto com a fase aquosa.

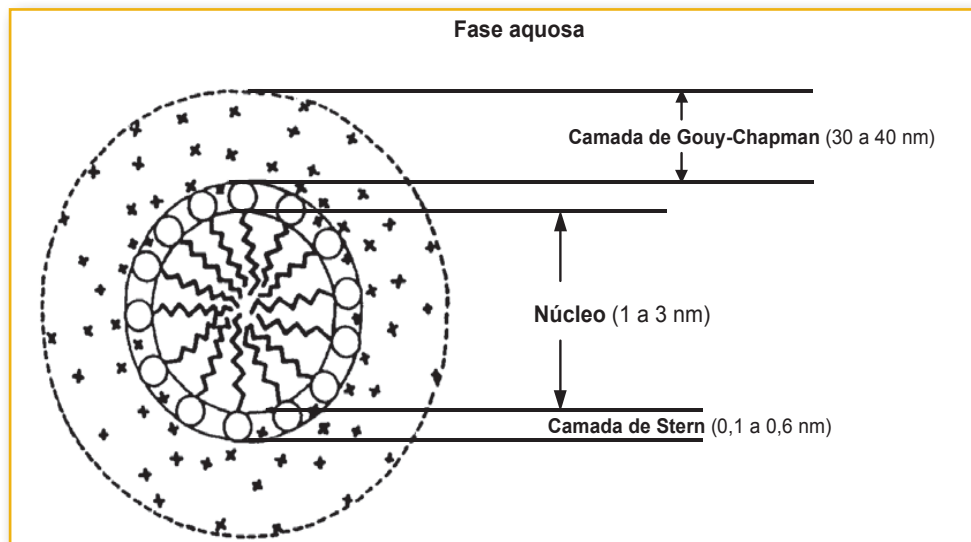


Fig. 5. Representação esquemática de uma micela de SDS.

Para uma determinada solução micelar, o número de moléculas que constitui as micelas é, geralmente, o mesmo e designa-se por número de agregação,  $Ag\#$ . Em certos casos, o aumento da concentração de composto anfílico origina, somente, um aumento do número de micelas, sendo pequeno o efeito sobre a sua forma e o seu tamanho. Todavia, noutros casos, com o aumento da concentração da substância anfílica formam-se micelas do tipo bastonete (Carey e Small, 1970; Shaw *et al.*, 1991). As forças que limitam o crescimento micelar dependem, principalmente, da repulsão electrostática entre os grupos polares, do grau de hidratação destes e da natureza e da concentração da substância anfílica (Helenius e Simons, 1975).

**36** A solubilidade de alguns compostos anfílicos, nomeadamente dos iónicos, depende não só da sua estrutura molecular, mas também da sua ionização, que varia geralmente em função do pH do meio. Para as moléculas das substâncias anfílicas existe um valor de pH acima do qual a solubilização destas aumenta acentuadamente, designado como pH micelar crítico (pH<sub>mc</sub>), (Jones e Chapman, 1995).

A temperatura do meio influencia, igualmente, a solubilidade dos compostos com características anfílicas. Refere-se como temperatura micelar crítica (tmc) de uma substância o valor de temperatura abaixo do qual não se verifica a formação de micelas, por as suas partes hidrofóbicas se manterem com carácter cristalino. A temperatura a que se verifica a solubilização das substâncias anfílicas solúveis, quando a sua concentração é igual à cmc, é designada por temperatura de Krafft,  $T_K$ , (Carey e Small, 1970; Carey e Small, 1972). Os parâmetros micelares, nomeadamente o tamanho e a forma das micelas, são, nos detergentes iónicos, sensíveis a variações do pH, da força iónica da solução e da temperatura. Assim, abaixo da  $T_K$  as moléculas iónicas do detergente formam agregados cristalinos hidratados tridimensionais que precipitam. Por outro lado, para valores de temperatura acima da  $T_K$ , o aumento da força iónica provoca um aumento do tamanho do agregado, que é acompanhado por uma mudança da disposição dos monómeros no agregado, passando da forma esférica para a elipsoide ou bastonete (Pramauro e Pelizzetti, 1996).

### III.II. MICELAS MISTAS

Os lípidos não polares e polares pertencentes às classes I e II, (ver Tabela 1), podem ser solubilizados por lípidos da classe III, por um fenómeno, tradicionalmente, denominado por “solubilização micelar”. As soluções assim preparadas são formadas por agregados micelares mistos. Os sistemas constituídos por agregados mistos podem, também, ser formados a partir de misturas de diferentes tipos de lípidos incluídos na classe III. Por conseguinte, uma micela mista é definida como um agregado, em cuja estrutura existem lípidos de mais do que uma espécie. Empiricamente, pelo menos uma das espécies químicas deverá ter capacidade para formar micelas simples em solução aquosa, pertencendo, portanto, à classe III de lípidos solúveis (Carey e Small, 1970; Carey e Small, 1972).

As soluções micelares mistas podem ser classificadas em quatro tipos, de acordo com a molécula solubilizada. Assim, os detergentes ou os lípidos polares, quer alifáticos (classe III. A), quer aromáticos (classe III. B), podem solubilizar:

- i) Lípidos não polares - micelas mistas do tipo A.
- ii) Lípidos anfílicos que não intumescem - micelas mistas do tipo B.
- ii) Lípidos anfílicos que intumescem - micelas mistas do tipo C.
- ii) Outras espécies químicas da classe III - micelas mistas do tipo D.

De todas os tipos de micelas mistas formadas, as constituídas por detergentes alifáticos ou por moléculas de sais biliares são, presentemente, os sistemas mais extensivamente estudados, dada a sua relevância, não só industrial, mas sobretudo fisiológica ou farmacêutica. Tal como referido, em certas situações clínicas, nas quais a bile é inexistente a nível duodenal, nomeadamente na obstrução biliar, constatou-se que uma grande percentagem dos triglicéridos ingeridos era ainda absorvida. Este fenómeno correlaciona-se com o facto de, mesmo a pH ligeiramente ácido, se formarem micelas de sais de ácidos gordos de cadeia longa e, possivelmente de lisolecitina. Estes agregados de moléculas anfifílicas podem incorporar, no seu interior, pequenas quantidades de produtos finais da hidrólise dos triacilglicéridos, como os monoglicéridos e ácidos gordos protonados. Todavia, a solubilização destes lípidos efectuada pelas micelas de lípidos solúveis do tipo III. A não é tão eficiente como a efectuada pelos agentes tensoactivos especializados do próprio organismo, designadamente, os sais biliares (Pignol *et al.*, 2000).

As particularidades das micelas mistas do tipo C formadas por lípidos polares solúveis, quer da classe III A, quer da classe III B são sumariadas na Tabela 5. Pode verificar-se, pela análise da tabela mencionada, que a relação de saturação, expressa pela razão  $\frac{\text{solubilizado}}{\text{solubilizante}}$ , das micelas de lisolecitina/

lecitina é baixa. Neste ponto, a viscosidade da solução é elevada e a estrutura da micela é altamente assimétrica. Por sua vez, os sais biliares possuem uma enorme faculdade de solubilizar compostos anfifílicos da classe II. Este facto tem uma importância proeminente nas suas acções fisiológicas, especialmente durante a digestão das gorduras.

Segundo Carey *et al.*, um valor máximo de duas moles de lecitina pode ser solubilizado por uma mole de sal biliar em solução micelar. O valor da cmc do sistema sal biliar/lecitina diminui bruscamente em função do aumento da concentração de lecitina. A cmc permanece constante para valores próximos dos  $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , no caso das micelas do sal sódico do ácido taurocólico. Concomitantemente, o peso micelar aumenta acentuadamente (Carey e Small, 1970; Carey e Small, 1972). Os sais biliares solubilizam os monoglicéridos com uma eficácia similar à observada para a lecitina. De facto, Hofmann verificou que a razão de saturação do gliceril-1-monoleato, dissolvido em soluções micelares de um dado sal biliar conjugado, variava entre 1,4 e 1,7. Esta relação era, na verdade, quatro a cinco vezes maior do que a capacidade de saturação que os detergentes de cadeia longa exibiam para o mesmo lípido (Carey e Small, 1970). Hofmann constatou igualmente que os monoglicéridos provocam um aumento do peso e do tamanho micelar, pois aumentam o número de moléculas de sal biliar por micela.

As diferenças assinaladas no comportamento de solubilização entre as micelas mistas formadas por detergentes alifáticos e por sais biliares podem ser explicadas, pelo menos em parte, pelas suas estruturas micelares diferentes. Carey e Small consideraram que as micelas mistas de sal biliar/lecitina continham uma região hidrocarbonada líquida, similar ao núcleo de uma micela

de um detergente alifático, na qual quantidades apreciáveis de lípidos pertencentes à classe I, (ver Tabela 1), nomeadamente, o colesterol e os ácidos gordos de cadeia longa, podem ser solubilizados (Carey e Small, 1970).

CARACTERÍSTICAS	Lisolecitina		Taurocolato de sódio	
	Sem lecitina	Com lecitina	Sem lecitina	Com lecitina
Razão de saturação molar <sup>a)</sup>	—	0,05 - 0,10	—	2,0
Micela	—	Saturada	—	Saturada
cmc <sup>b)</sup>	0,195	—	3,1	0,2
Forma	Esférica	Assimétrica	Esférica	Quase esférica
Tamanho - Peso micelar	92 400	1 500 000	2 800	125 000
Ag# do lípido solúvel	180	2 630	5	62
Moléculas solubilizadas/micela	0	280	0	125
Capacidade de solubilização (outra)	—	—	—	Lípidos polares (I)

<sup>a)</sup> Razão molar: solubilizado/solubilizante; <sup>b)</sup> Expressa em mmol dm<sup>-3</sup>.

**Tab. 5.** Algumas características das micelas mistas do tipo C, obtidas a 20 °C e em cloreto de sódio 0,15 mol dm<sup>-3</sup> (Ayd, 1997; Lopes, 1997).

O colesterol é um lípido praticamente insolúvel em água pura. As soluções simples de sais biliares solubilizam muito pouco colesterol, o que se exprime por uma zona micelar muito pequena na representação do diagrama de fases sal biliar/colesterol/água. Dado que, tanto as moléculas de colesterol como as de sal biliar possuem em comum o núcleo ciclopentanoperidrofenantreno, poder-se-á pensar que a estrutura da micela mista sal biliar/colesterol resultaria da substituição de uma molécula de sal biliar por uma de colesterol e, portanto, as micelas mistas assim formadas teriam, aproximadamente, o mesmo tamanho das micelas simples de sal biliar. Contudo, a comparação dos respectivos coeficientes de difusão revelou que a micela mista é bastante maior, o que é indicador de uma capacidade superior de solubilização de colesterol (Carey e Small, 1970; Carey e Small, 1972).

### III.III. LIPOSSOMAS

Os agentes anfílicos compostos por um grupo hidrofílico ligado a duas cadeias hidrofóbicas possuem a capacidade de, espontaneamente, formar agregados em bicamada, que assumem a forma de uma estrutura esférica e fechada (vesícula), quando dispersos em solução aquosa. Esta estrutura fechada envolve um determinado volume de solução aquosa, variando o seu tamanho desde alguns nanómetros a micrómetros de diâmetro (Lasic, 1993; New, 1990). A variação considerável da função de Gibbs quando uma molécula anfílica passa do meio aquoso para um ambiente hidrofóbico (15,3 kcal/mol para a DPPC e 13,3 kcal/mol para a DMPC, por exemplo) explica a tendência dos lípidos para se organizarem na forma de bicamada, de modo a excluir a água do ambiente formado pelas cadeias carbonadas (Oliveira, 1998).

Na estrutura dos fosfolípidos encontram-se duas cadeias carbonadas em conjugação com um grupo polar, o que sugere um deslocamento do equilíbrio hidrófilo-lipófilo no sentido da lipofilia. A cmc dos fosfolípidos situa-se à volta de  $10^{-10}$  -  $10^{-11}$  M (a cmc do DPPC é  $2 \times 10^{-11}$  M). Isto sugere que a concentração de monómeros em solução aquosa é extremamente baixa (Jones e Chapman, 1995). A organização das moléculas em bicamadas relaciona-se com a necessidade do sistema adquirir um arranjo termodinamicamente compatível com uma baixa energia livre. Assim, os fosfolípidos orientam-se maximizando a superfície de exposição dos seus grupos polares ao meio aquoso, evitando a existência de interfaces entre as suas partes hidrófobas e a água. A hidratação do filme lipídico origina a formação de bicamadas lipídicas, organizadas em estruturas tubulares que se alongam, podendo atingir cerca de 100  $\mu\text{m}$  de comprimento. Durante esta fase, as bicamadas estabilizam a uma distância de equilíbrio resultante do compromisso entre as forças repulsivas e atractivas. A agitação do sistema provoca o destacamento das estruturas tubulares, que imediatamente se fecham e originam lipossomas (Lasic, 1993).

Dado o mecanismo da sua formação, as vesículas não são necessariamente esféricas, apresentando por vezes formas ovais. Ao longo do tempo, estas estruturas vão sendo progressivamente transformadas em estruturas esféricas, em que a energia de curvatura é mínima. Isto acontece provavelmente devido a um “flip-flop” direccional das moléculas fosfolipídicas, uma vez que o número inicial na monocamada externa deverá ser superior ao correspondente à monocamada interna.

Diversos parâmetros influenciam o processo de formação dos lipossomas, como a relação lípido/água, a temperatura, a agitação do sistema, a composição lipídica, o pH, a força iónica e a osmolaridade da fase aquosa (Barbosa, 1995).

#### **IV. IMPLICAÇÕES BIOFARMACÊUTICAS**

As formas farmacêuticas administradas por via oral sofrem dissolução nos meios biológicos, seguida de absorção do fármaco para a circulação sistémica (Gibaldi e Feldman, 1970). Os agentes tensioactivos, de origem natural ou sintética, constituem um dos mais importantes grupos de adjuvantes usados nas preparações farmacêuticas que podem desempenhar uma acção relevante nas características farmacocinéticas dos fármacos. A propriedade de formar micelas e a propriedade correlativa de serem compostos anfifílicos, são as que genericamente, conferem grande importância farmacêutica às moléculas daqueles compostos (Atwood e Florence, 1983; Pramauro e Pelizzetti, 1996).

O papel importante das interacções de fármacos com os agregados micelares, presentes no conteúdo gastrointestinal, na influência da cinética de dissolução e, conseqüentemente, na velocidade de absorção de substâncias com interesse biológico ou farmacológico, ainda não foi totalmente explorado.

Contudo, foram referidos na literatura, alguns trabalhos de investigação que descreveram a implicação dos sais biliares na solubilização de variadas substâncias orgânicas, quer endógenas quer exógenas, e desta forma, nas suas biodisponibilidades (Atwood e Florence, 1983; Engel e Giggi, 1969; Imai *et al.*, 1983; Nightingale *et al.*, 1971; Nook *et al.*, 1987; Roe e Barry, 1985; Schwarz *et al.*, 1996; Smidt *et al.*, 1987). No organismo humano, os sais biliares e a lecitina presentes na bile combinam-se com o colesterol para formar micelas solúveis. Assim sendo, um dos aspectos fisiológicos mais importantes das micelas mistas sal biliar/lecitina será o de actuarem como veículos de acentuada solubilização de lípidos anfifílicos insolúveis da classe I, formando micelas mistas complexas de três componentes (Atwood e Florence, 1983; Jones e Chapman, 1995; Carey e Small, 1970; Carey e Small, 1972). Estabelece-se, então, que as soluções micelares de sais biliares solubilizam maiores quantidades de colesterol, quando em solução está presente a lecitina. Na ausência destas micelas mistas, o colesterol não é completamente solubilizado na bile, precipitando e formando, conseqüentemente, cálculos biliares de colesterol (Mazer e Carey, 1983). Outras diferentes condições são passíveis de produzir, também, a precipitação de colesterol e incluem, quer uma secreção excessiva de colesterol na bile, quer uma possível inflamação do epitélio da vesícula biliar.

É de referir ainda que, sem a prévia solubilização em micelas mistas constituídas por sal biliar e lecitina, nem o colesterol, nem alimentos lipídicos ou outros compostos lipossolúveis, designadamente, vitaminas e substâncias com interesse terapêutico, podem ser absorvidos no intestino. Os sais biliares podem, na verdade, facilitar a absorção de fármacos muito pouco solúveis, por aumento da solubilização destes compostos no interior dos seus agregados micelares (Bates *et al.*, 1966; Campos *et al.*, 1994; Gibaldi e Feldman, 1970; Merino *et al.*, 1994; Mithani *et al.*, 1996; Mukerjee e Cardinal, 1976). No entanto, o desenvolvimento de interações moderadamente estáveis fármaco/micelas de sal biliar podem condicionar negativamente a sua velocidade de absorção intestinal (Bottari e Festa, 1999; Poelma *et al.*, 1989; Utsumi *et al.*, 1974). A absorção de fármacos altamente polares é igualmente auxiliada pela existência de micelas de sais biliares no lúmen do intestino delgado (Atwood e Florence, 1983, Bottari e Festa, 1999; Campos *et al.*, 1994; Nightingale, 1969). Este fenómeno está intimamente relacionado com uma interacção entre os sais biliares e os fosfolípidos das membranas fisiológicas, fluidificando a sua estrutura e permitindo, desta forma, a difusão de fármacos através daquelas. Outros mecanismos possíveis estão referidos para justificar o efeito dos sais biliares na alteração da permeabilidade das biomembranas, nomeadamente a diminuição da viscosidade do muco produzido pelas células epiteliais da mucosa do intestino, e a redução do peristaltismo intestinal (Gibaldi e Feldman, 1970; Nook *et al.*, 1987).

No organismo humano, uma das principais vias de eliminação de numerosos fármacos é a biliar. Contudo, a importância das micelas de sais biliares na distribuição e no metabolismo desses compostos, ainda não foi tão claramente estabelecido, como a do papel que estes sais têm na absorção das gorduras.

O possível desenvolvimento de interações fármaco/micelas de sais biliares poderá ter uma função considerável no tempo de semi-vida e, portanto, na actividade farmacológica e terapêutica desses fármacos (Atwood e Florence, 1983). Os ácidos biliares possuem também um grande interesse devido ao seu papel no possível tratamento da litíase biliar. De facto, a administração dos ácidos quenodesoxicólico ou ursodesoxicólico faz baixar a proporção relativa do colesterol na bile. Consequentemente, em doentes com cálculos de colesterol, a bile, que pode estar sobressaturada, tornar-se-á não saturada e, se a superfície dos cálculos lhe for acessível, estes poder-se-ão dissolver muito lentamente (Guyton, 2003; Igimi e Carey; 1981; Menger e MacCreery, 1974; Paumgartner *et al.*, 1991; Roda *et al.*, 1995, Roe e Barry, 1985).

Recentemente, o estudo dos sistemas constituídos por micelas de sais biliares e de fosfatidilcolina, mostrou-se de grande importância, não só para a compreensão da fisiologia da bile e das propriedades dos sistemas micelares mistos na absorção do colesterol e de outros produtos de digestão de lípidos, mas essencialmente, como potenciais sistemas transportadores de agentes bioactivos (Hjelm *et al.*, 1992). O desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas, capazes de beneficiar a solubilização de fármacos praticamente insolúveis em solução aquosa, tem sido amplamente conseguido pela utilização de micelas mistas. Estas proporcionam igualmente uma interface micela/água relativamente polar, susceptível de solubilizar compostos farmacológicos polares. Uma vez que as micelas mistas de sal biliar/fosfatidilcolina possuem um núcleo hidrofóbico maior, elas devem, em princípio, actuar mais eficientemente como agentes solubilizantes de compostos lipossolúveis, do que as micelas simples do mesmo sal (Merino *et al.*, 1994).

A utilização de micelas mistas de sal biliar/lecitina como sistemas de libertação de fármacos apolares, para a administração endovenosa, possui muitos aspectos estimulantes e atractivos. Na verdade, estes fármacos encontram-se, desta forma, dispersos num meio aquoso e, quando optimizadas as condições experimentais, as soluções apresentam-se com um aspecto límpido, isotrópico, o que permite uma dose uniforme e uma fácil aplicação. Para além do mais, a diluição, e portanto a remoção subsequente de moléculas de sais biliares, não provoca a precipitação dos fármacos, uma vez que as vesículas de lecitina formadas nestas condições conseguem associar e solubilizar as moléculas do composto (Lasic, 1993). Em oposição com outros sistemas, designadamente emulsões e lipossomas, as micelas mistas envolvem técnicas de preparação simples e rápidas.

*In vitro*, a estabilidade de fármacos pode ser melhorada, dado que a adsorção destes às paredes da embalagem, bem como os processos de hidrólise, são minimizados. As formulações dos fármacos em sistemas micelares mistos podem ser armazenados como liofilizados e, uma vez re-hidratados, são caracterizadas pelas propriedades das soluções originais.

Quando um dado fármaco, polar ou apolar, é administrado sob a forma de micelas mistas sal biliar/lecitina, o seu comportamento farmacocinético, no-

42 meadamente a sua biodistribuição, difere consideravelmente do exibido pela respectiva forma livre ou do apresentado em soluções de micelas simples de sais biliares, passando a ser determinado pelas características dos agregados mistos. Tal facto poderá proporcionar vantagens diversas, uma das quais consiste na redução da toxicidade do fármaco. Efectivamente, estudos precedentemente efectuados mostram que as micelas mistas formadas por taurodesoxicolato de sódio/lecitina eram menos tóxicas do que as micelas constituídas unicamente por aquele sal biliar. Esta diminuição da toxicidade, proporcionada pelas micelas mistas, está presumivelmente relacionada com a redução da solubilização de fosfolípidos das membranas biológicas, não perturbando, desta forma, a sua integridade (Coleman, 1987).

Sabe-se que os fármacos lipossolúveis injectados por via endovenosa provocam em muitos doentes flebites, tromboflebites, prurido e eritema, sendo um processo que vem, usualmente, acompanhado de dor intensa. Esta pode ocorrer como resultado da interacção do fármaco com as terminações nervosas presentes nas paredes venosas ou de uma precipitação do composto no local da injeção. Num estudo pormenorizado e descrito por A. Ayd (Ayd, 1997), foi demonstrado que as moléculas de dois antibióticos macrólidos, a eritromicina e a claritromicina, orientavam-se nas micelas mistas de glicodesoxicolato/lecitina de forma a que as porções dos referidos fármacos responsáveis pela produção de dor se encontravam protegidas. Assim, quando as soluções dos dois macrólidos eram administradas por via endovenosa, a dor encontrava-se minimizada.

Actualmente, as micelas mistas de tauroquenodesoxicolato de sódio/lecitina têm sido propostas como modelos eficazes para o tratamento de cálculos de colesterol. Estudos anteriores, envolvendo os sistemas mistos sal biliar/lecitina na dissolução dos referidos cálculos, já se tinham mostrado muito promitentes (Higuchi e Prakongpan, 1973).

Pode concluir-se então que, dada a sua composição, as micelas mistas são consideradas sistemas altamente biocompatíveis, apresentando-se com propriedades similares às das biomembranas e praticamente desprovidas de toxicidade. Estas propriedades, juntamente com a capacidade de poderem transportar uma grande diversidade de substâncias, quer incorporadas no seu núcleo, quer associadas à fase hidrófila, contribuem decisivamente para que as micelas mistas sal biliar/fosfolípido sejam consideradas como os sistemas mais promissores no domínio da solubilização, do transporte e da libertação de compostos com interesse farmacêutico. Alguns processos e/ou sistemas utilizados na solubilização de compostos lipófilos são apresentados na Tabela 6. Pode visualizar-se, também, as principais limitações específicas e/ou desvantagens.

Formulação	Problemas/Limitações	Exemplo
Ajuste de pH	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Precipitação a pH fisiológico</li> <li>• Não é aplicável a compostos não ionizáveis</li> </ul>	- Tioguanina ajustada a pH 11,0
Co - solvente (etanol)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Precipitação após diluição</li> </ul>	- Ciclosporina A - 17- $\beta$ -Estradiol
Solubilização micelar	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Precipitação após diluição</li> </ul>	- Anfotericina B - Ciclosporina A - Diazepam
Pró - fármacos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Muitas estruturas não são apropriadas</li> <li>• Nova identidade do fármaco</li> </ul>	- Nucleótidos
Emulsão	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Instabilidade química</li> <li>• Nem todos os compostos são solubilizados em solventes apolares</li> <li>• Preparação complicada</li> </ul>	- Espiromustina
Ciclodextrina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Toxicidade</li> <li>• Eficiência de encapsulação fraca</li> </ul>	- Taxol
Lipossomas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Instabilidade química</li> <li>• Preparação complicada</li> </ul>	- Doxorubicina

Tab. 6. Sistemas utilizados para solubilizar, em meio aquoso, compostos insolúveis em água.

De forma a obter o máximo de vantagens da ligação entre as micelas, simples ou mistas, de detergentes sintéticos ou naturais, e as propriedades farmacêuticas e farmacológicas de compostos bioactivos, o conhecimento da estrutura anfílica e das suas propriedades fisico-químicas, a descrição quantitativa das interacções soluto/detergente e o efeito destas nos equilíbrios químicos e na reactividade devem ser cuidadosamente considerados. Uma compreensão mais detalhada dos ambientes micelares é importante para o entendimento da capacidade das micelas em actuar como agentes solubilizantes, o que permitirá obter informação adicional das possíveis localizações das substâncias solubilizadas e dos mecanismos de transporte de fármacos através das membranas biológicas.

## ■ BIBLIOGRAFIA

Atwood, D.; Florence, A.T. (1983). *Surfactants Systems. Their Chemistry, Pharmacy and Biology*. New York, Chapman and Hall.

Ayd, S.W. (1997). *Phospholipid/Bile Salt Mixed Micelles and Their Application in Predictive Models of Solubility Improvement*. Dissertação de Doutoramento. Graduate College of the University of Illinois at Chicago.

Barbosa, C.M.G. (1995). *Desenvolvimento e Caracterização de Formulações Lipossómicas de Monofosfato de Vidarabina Para o Tratamento da Hepatite B Crónica*. Dissertação de Doutoramento. Faculdade de Farmácia de Universidade do Porto.

Barenholz, Y.; Lasic, D.D. (1998). *Handbook of Nonmedical Applications of Liposomes: From Design to Microreactors*. III Volume. U.S.A., CRC.

- Bates, T.R.; Gibaldi, M.; Kanig, J.L. (1966). Solubilizing Properties of Bile Salt Solutions I. *In: J. Pharm. Sci.*, 55, pp. 191-199.
- Bottari, E.; Festa, M.R. (1999). On the Protonation of Glycocholate and Glycodeoxycholate Ions. *In: Chem. Speciat. Bioav.*, 11, pp. 77-83.
- Campos, S.; Climent, E.; Cortés, A.; Delfina, J.M. (1994). Compared Effects of synthetic and Natural Bile Acid Srfactants on Xenobiotic Absorption: IV. Sudies with Taurocholate in the Rat Small Intestine. *In: Int. J. Pharm.*, 109, pp. 197-207.
- Carey, M.C., Small, D.M. (1970). The Characteristics of Mixed Micellar Solutions with Particular Reference to Bile. *In: Amer. J. Med.*, 49, pp. 590-608.
- Carey, M.C.; Small D.M. (1972). Micelle Formation by Bile Salts. Physical-Chemical and Thermodynamic Considerations. *In: Arch. Intern. Med.*, 130, pp. 506-527.
- Clas, S.D. (1991). Increasing the In Vitro Acid Binding Capacity of Diethylminoethylcellulose by Quaternization. *In: J. Pharm. Sci.*, 80, pp. 891-894.
- Coleman, R. (1987). Bile Salts and Biliary Lipids. *In: Biochem. Soc. Trans.*, 15, pp. 68S-89S
- Engel, R.H.; Giggi, S.J. (1969). Intestinal Absorption of Heparin Facilitated by Sulfated or Sulfonated Surfactants. *In: J. Pharm. Sci.*, 58, pp. 706-710.
- Erpecum, K. J.; Carey, M.C. (1997). Influence of Bile Salts on Molecular Interactions Between Shingomyelin and Cholesterol: Relevance to Bile Formation and Stability. *In: Biochim. Biophys. Acta*, 1345, pp. 269-282.
- Fattal, D. R.; Andelman, D.; Shaul, A.B. (1995). The Vesicle-Micelle Transition in Mixed Lipid-Surfactant Systems: A Molecular Model. *In: Langmuir*, 11, pp. 1154-1161.
- Fendler, J. H. (1982). *Membrane Mimetic Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- Fox S.I. (1996). *Human Physiology*. 5ª edition. U.S.A., Wn. C. Brown Publishers.
- Ganong, W. (1999). *Review of Medical Physiology*. 19ª edition. U.S.A., Appleton & Lang-Prentice Hall.
- Gibaldi, M.; Feldman S. (1970). Relation Between Micellar Structure of Model Bile and Activity of Esterase. *In: J. Pharm. Sci.*, 59, pp. 579-589.
- Gouin, S. ; Zhu, S.S. (1996). Synthesis of 3 $\alpha$ - 3 $\beta$ -Dimers From Selected Bile Acids. *In: Steroids*, 61, pp. 664-669.
- Guyton. (2003). *Tratado de Fisiologia Médica*. 10ª edition. Rio de Janeiro, Editora Guanabara.
- Helenius, A.; Simons K. (1975). Solubilization of Membranes by Detergents. *In: Biochim. Biophys. Acta* 415, pp. 29-79.
- Higuchi, W.I.; Prakongpan, S.; Young, F. (1973). Mechanisms of Dissolution of Human Cholesterol Gallstones. *In: J. Pharm. Sci.*, 62, pp. 945-948.
- Igimi, H.; Carey, M.C. (1981). Cholesterol Gallstone Dissolution in bile: Dissolution Kinetics of Crystalline Cholesterol with Chenodeoxycholate, Ursodeoxycholate and Their Glycine and Taurine Conjugates. *In: J. Lipid Res.*, 22, pp. 254-270.
- Hjelm, R.P.; Thiyagarajan, P.; Onyuksel H.A. (1992). Organization of Phosphatidylcholine and bile Salt in rodlike Mixed Micelles. *In: J. Phys. Chem.*, 96, pp. 8653-8661.
- Imai, J.; Hayashi, M.; Awazu, S.; Hanano, M. (1983). Solubilization of *dl*- $\alpha$ -Tocopherol by Bile Salts, Polysorbate 80 and Egg Lecithin. *In: Chem. Pharm. Bull.* 31, pp. 4077-4082.
- Jones, M.N.; Chapman D. (1995). *Micelles, Monolayers and Biomembranes*. New York, Wiley-Liss Inc..
- Lasic, D.D. (1993). *Liposomes from physics to applications*. New York, Elsevier.
- Lopes, A.M.G. (1997). *Partição de Xenobióticos Orgânicos em Agregados Anfífilicos. Uma Proposta de Novos Previsores de Bioconcentração*. Dissertação de Doutorado.

Departamento de Química. Instituto de Tecnologia Química e Biológica de Universidade Nova de Lisboa.

Love, L.J.C.; Habarta, J.G.; Dorsey, J.G. (1984). The Micelle-Analytical Chemistry Interface. *In: Anal. Chem.*, 56, pp. 1132-1148.

Maire, M.; Champeil, P.; Moller, J. (2000). Interaction of Membrane Proteins and Lipids With Solubilizing Detergents. *In: Biochim. Biophys. Acta*, 1508, pp. 86-111.

Mazer, N.A.; Carey, M.C. (1983). Quasi-Elastic Light-Scattering Studies of Aqueous Biliary Lipid systems. Cholesterol Solubilization and Precipitation in Model Bile Solutions. *In: Biochemistry*, 22, pp. 426-442.

Mazer, N.A.; Schutenberger, P.; Carey, M.C.; Preisig, K.; Weigand, K.; Känzig, W. (1984). Quasi-Elastic Light Scattering Studies of Native Hepatic Bile from the Dog: Comparison with Aggregative Behavior of Model Biliary Lipid Systems. *In: Biochemistry*, 23, pp. 1994-2005.

Menger, F.M.; MacCreery M.J. (1974). Kinetic Characterization of Bile Salt Micelles. *In: J. Am. Chem. Soc.*, 96, pp. 121-126.

Merino, V.; Bermejo, M.V.; Campos, S.; Garrigues, T.M.; Delfina, J.M. (1994). Trabajos Experimentales : Medicamentos. *In: Cienc. Pharm.*, 4, pp. 231-244.

Mithani, S.D.; Bakatselou, V.; TenHoor, C.N.; Dessman, J.B. (1996). Estimation of the Increase in Solubility of Drugs as a Function of Bile Salt Concentration. *In: Pharm. Res.*, 13, pp. 163-167.

Mukerjee, P.; Cardinal, J. (1976). Solubilization as a Method for Studying Self-Association: Solubility of Naphthalene in the Bile Salt Sodium Cholate and the Complex Pattern of Its Aggregation. *In: J. Pharm. Sci.* 65, pp. 882-886.

New, R. R. C. (1990). *Liposomes - A Practical Approach*. Rickwood D., Hames B. D., Eds. Oxford, IRL Press.

Nightingale, C.H.; Wynn, R.J.; Gibaldi M. (1969). Physiologic Surface-Active Agents and drug Absorption III: Effect of Bile Salt on Drug Absorption in Goldfish. *In: J. Pharm. Sci.*, 58, pp. 1005-1007.

Nightingale, C.H.; Axelson, J.E.; Gibaldi, M. (1971). Physiologic Surface-Active Agents and drug Absorption VIII: Effect of Bile Salt on Sulfadiazine Absorption in the Rat. *In: J. Pharm. Sci.* 60, pp. 145-147.

Nook, T.; Doelker, E.; Buri, P. (1987). Role de la bile et des sels biliaries dans l'absorption des médicaments. *In: Pharm. Acta Helv.*, 62, pp. 274-281.

O'Connor, C.; Chang, B.T.; Wallace, R.G. (1983). Studies in Bile Salt Solutions. 1-Surface Tension Evidence for a Stepwise Aggregation Model. *In: J. Colloid and Interface Sci.*, 95, pp. 410-419.

Oliveira, M. V. S. G. (1998). *Efeito de Vesículas Mistas de Fosfolípidios/Anfifílico Catiônico Sobre a Velocidade de Descarboxilação do Íon 6-nitrobenzisoaxol-3-carboxilato*. Tese de Doutorado. Departamento de Bioquímica. Instituto de Química. Universidade de São Paulo.

Paula, S.; Süss, W.; Tuchtenhagen, J.; Blume, A. (1995). Thermodynamics of Micelle Formation as a Function of Temperature: A High Sensitivity Titration Calorimetry Study. *In: J. Phys. Chem.*, 99, pp. 11742-11751.

Paumgartner, G.; Stiehl, A.; Gerok, W. (1991). *Bile Acids as Therapeutic Agents. From Basic Science to Clinical Practice*. The Netherlands, Kluwer Academic Publishers.

Pignol, D.; Ayvazian, L.; Kerfelec, B.; Timmins, P.; Crenon, I.; Hermoso, J.; Camps, J.C.; Chapus, C. (2000). Critical Role of Micelles in Pancreatic Lipase Activation Revealed By Small Angle Neutron Scattering. *In: J. Biomed. Chem.*, 11, pp. 4220-4224.

Poelma, F.G.; Tukker, J.J.; Crommelin, D.J.A. (1989). Intestinal Absorption of drugs I: The Influence of Taurocholate on the Absorption of Dantrolene in the small intestine of Rat. *In: J. Pharm. Sci.* 78, pp. 285-289

- Pramauro, E.; Pelizzetti, E. (1981). Effect of Micellar Systems on The Equilibrium of Chemical Reactions. *In: Anal. Chim. Acta*, 126, pp. 253-257.
- Pramauro, E.; Pelizzetti, E. (1996). *Surfactants in Analytical Chemistry. Applications of Organized Amphiphilic Media*. New York, Elsevier.
- Prista, L.N.; Alves, A.C.; Morgado, R.M.R. (1991). *Técnica Farmacêutica e Farmácia Galénica*. I Volume, 4ª edição. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian.
- Reis, M.S.F.F.H. (1995). *Ácidos Biliares e Actividade Biológica. Alguns Aspectos da Relação Entre a Estrutura Química e as Propriedades Físico-Químicas*. Dissertação de Doutoramento. Departamento de Química-Física. Faculdade de Farmácia de Universidade do Porto.
- Roda, A.; Cerré, A.; Fini, A.; Sipahi, A.; Baraldini, M. (1995). Experimental Evaluation of a Model for Predicting Micellar Composition and Concentration of Monomeric Species in Bile Salt Binary Mixtures. *In: J. Pharm. Sci.*, 84, pp. 593-598.
- Roe, J.M.; Barry, B.W. (1985). Bile Salt Association (Cholate, Deoxycholate, Chenodeoxycholate, and Ursodeoxycholate) and Interactions with Aromatic Alcohols (Benzyl, 2-Phenylethanol, and 3-Phenylpropanol). *In: J. Colloid and Interface Sci.*, 107, pp. 398-404.
- Schwarz, M.A.; Neubert, R.H.H.; Rüttinger, H.H. (1996). Application of Capillary Electrophoresis for Characterizing interactions Between Drugs and Bile Salts. Part I. *In: J. Chromatog. A* 745, pp. 135-143.
- Shaw, R.; Elliott, W.H.; Barisas, B.G. (1991). Estimation of Critical Micelle concentrations of Bile Acids by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography. *In: Mikrochim. Acta* 3, pp. 137-145.
- Small, D.M. (1968). Size and Structure of Bile Salt Micelles. Influence of Structure, Concentration, Counterion Concentration, pH, and Temperature. *In: J. Lipid Res.*, 84, pp. 31-51
- Small, D.M. (1975). Surface and Solution Properties of Steroid Antibiotics: 3-Acetoxyfusidic Acid, Cephalosporin P<sub>1</sub> and Helvolic Acid. *In: Biochemistry*, 14, pp. 4896-4905.
- Smidt, J. H.; Offringa, J.C.A.; Crommelin, D.J.A. (1987). Dissolution Kinetics of Griseofulvin in Sodium Dodecylsulphate Solutions. *In: J. Pharm. Sci.*, 76, pp. 711-714.
- Street, J.M.; Trafford, J.H.; Makin, H.L.J. (1983). The Quantitative Estimation of Bile Acids and Their Conjugates in Human Biological Fluids. *In: J. Lipid Res.*, 24, pp. 491-511.
- Uematsu, S.; Uchida, T.; Kinoshita, A.; Kimura, F.; Akahori Y. (1995). Mechanisms of Surfactant Effects on Drug Absorption. *In: Biochim. Biophys. Acta*, 1258, pp. 122-134.
- Utsumi, I.; Kohno, K.; Takeuchi, Y. (1974). Surfactant Effects on Drug Absorption III: Effects of Sodium Glycicholate and Its Mixtures with Synthetic Surfactants on Absorption of Thiamine Disulfide compounds in Rat. *In: J. Pharm. Sci.* 63, pp. 676-681.
- Vander, A.; Sherman, J.; Luciano, D. (2003). *Human Physiology*. 9ª edition. New York, McGraw-Hill Inc..