



Cláudia Alexandra Vieira Carneiro

**O PAPEL DAS INTERACÇÕES
FÁRMACO-MEMBRANA NOS EFEITOS
CARDIOVASCULARES DE
β-BLOQUEADORES**

Dissertação do 2º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em
Controlo de Qualidade

Orientador: Doutora Marlene Susana Dionísio Lúcio

Co-orientador: Professora Doutora Maria de La Salette Freitas Fernandes Hipólito Reis
Dias Rodrigues

Porto, Junho de 2010

É autorizada a reprodução integral desta Dissertação apenas para efeitos de investigação, mediante declaração escrita do interessado, que a tal se compromete;

Agradecimentos

Neste percurso de quase três anos é inevitável que muitas pessoas tenham cruzado a minha vida, pessoas essas, a quem devo o meu sincero agradecimento:

À instituição Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, por me ter acolhido novamente, agora no âmbito do Mestrado em Controlo de Qualidade.

À Prof. Dra. Beatriz Oliveira, por me ter telefonado numa manhã do início de Outubro, a comunicar a existência de uma vaga para frequentar este Mestrado. Foi aí que tudo isto começou. Também agradeço todo o apoio prestado durante o decorrer do mesmo.

À Farmácia de Recarei, na pessoa da Dra. Helena Andrade e aos meus colegas (Anabela, Diogo, Fátima e Paula) que me deram toda a força para embarcar neste projecto.

Ao Prof. Dr. Costa Lima, por me ter permitido fazer uns “cozinhados” no laboratório de Química-Física e, sobretudo, por me ter feito perceber um pouco mais sobre MIA. Não mais esquecerei o maior de todos os ensinamentos que partilhou comigo: “só não gostamos daquilo que não percebemos”.

À Dra. Salette Reis, por me ter acolhido no “Mundo dos Lipossomas” e pela orientação deste trabalho. Obrigada pela paciência, saber e por me ter motivado quando as coisas nem sempre corriam bem.

À Dra. Marlene Lúcio, pela orientação deste trabalho. Agradeço a disponibilidade, paciência e amizade. Obrigada, sobretudo, pela clarividência e persistência que não me deixaram desistir quando não encontrava o caminho certo.

A todas as pessoas que integram o laboratório de Química-Física, que me receberam e me proporcionaram um bom ambiente de trabalho. Destas pessoas, não posso deixar de referir com mais ênfase as pessoas com quem lidei mais de perto: a Ana, a Marisa e a Diana. Ao André, muito obrigada pelo bom humor e incentivos.

À Cláudia, a minha “Bombeira”. Muito obrigada por estares sempre disponível para me ajudar, para me ensinar, para abdicares do fluorímetro para eu poder trabalhar. És uma excelente pessoa, sempre positiva e passas bem para quem está ao teu lado. Muito obrigada, mesmo!

Aos meus colegas de Mestrado, sobretudo aos que, para além disso, se tornaram grandes amigos: ao Hugo; à Maria João; ao Christian pelo seu génio único, inteligência e

amizade; à Rita sempre pronta para as borgas, obrigada pela amizade e bons momentos passados.

À Sofia, cúmplice das mais difíceis e alegres horas! Companheira dos bons momentos das aulas, dos trabalhos de grupo, das horas no laboratório! Obrigada por seres tão fantástica, por seres única, por seres minha Amiga!

Obrigada à minha Família, que sempre me incentivou a avançar com este projecto. Agradeço o apoio que nunca faltou mesmo quando o estudo me roubava tempo em família. Desculpem o mau humor e desespero que às vezes tomavam conta de mim. À Inês, minha “irmã” mais nova que ficou com menos ajudas nos estudos. Avó Rita, obrigada pela força. À Catarina, muito obrigada pelos jantares que nunca te ajudei a fazer, por ainda estar na faculdade. Obrigada pela ajuda, força, pelos bons momentos passados no decorrer deste Mestrado que acompanhaste a par comigo.

Ao Nuno, por certo o bem mais importante que este Mestrado me ofereceu! Obrigada por teres entrado na minha vida! Agradeço a paciência, ajuda e a tua incondicional disponibilidade! És o significado de Companheiro!

Aos meus Pais, por tudo o que me têm proporcionado ao longo da desta vida! Obrigada por me ensinarem que a Educação, o Conhecimento, o Trabalho e a Solidariedade são as alavancas para um mundo melhor!

“Se podes olhar, vê. Se podes ver, repara.”

in Livro dos Conselhos

Resumo

As interacções fármaco-membrana desempenham um importante papel para: o desenvolvimento de novos fármacos; o desenvolvimento de sistemas de libertação controlada de fármacos; a compreensão dos efeitos terapêuticos e tóxicos; o estabelecimento de relações estrutura-actividade; a compreensão dos efeitos ecotoxicológicos dos fármacos; a compreensão do mecanismo de resistência a múltiplos fármacos; o controlo da inibição enzimática; e no controlo da sinalização celular. Algumas destas áreas são importantes para o Controlo de Qualidade.

De facto, o ambiente lipídico da membrana ganha um relevo crescente, à medida que se vai conhecendo de que forma as alterações dos lípidos das membranas são capazes de causar distúrbios membranares, afectando, assim, várias funções celulares.

Neste trabalho, recorre-se aos lipossomas (como modelos membranares) e a diversas técnicas, de modo a estudar as interacções fármaco-membrana, de dois fármacos β -bloqueadores.

Pretende-se, então, conhecer a distribuição deste tipo de fármacos (através de técnicas de espectrofluorimetria e espectrofluorimetria derivativa para a determinação do coeficiente de partição) e determinar os efeitos que os fármacos β -bloqueadores exercem, directa ou indirectamente, ao nível das propriedades físico-químicas dos modelos membranares. As alterações na biofísica membranares foram estudadas por técnicas de anisotropia de fluorescência em estado estacionário.

Foram encetados estudos de modo a avaliar a ligação à membrana através da utilização de métodos de fluorescência com a sonda ANS, e utilizaram-se técnicas de dispersão de luz dinâmica para avaliar o efeito destes fármacos quer no tamanho, quer na carga membranares (por determinação do potencial zeta). As informações obtidas, a partir das técnicas utilizadas, permitiram propor uma localização membranares para os fármacos em estudo.

Com base nos estudos realizados foi possível concluir que os fármacos cardiovasculares apresentam uma interacção significativa com a bicamada lipídica, apresentando: uma elevada partição membranares; efeito de fluidificação da membrana e evidência de alteração da carga superficial membranares. Tais efeitos são correlacionáveis com os efeitos farmacológicos dos fármacos.

Palavras-Chave: β -bloqueadores; lipossomas; interacção fármaco-membrana; técnicas biofísicas.

Abstract

Drug-membrane interactions play an important role: on the development of new drugs; on the development of drug delivery systems; understanding the therapeutic and toxic effects of drugs; on the establishment of structure-activity relations; understanding the ecotoxicological effects of drugs; understanding multi-drug resistance mechanisms; controlling enzymatic inhibition; and controlling cellular signaling. Some of these areas are important to Quality Control.

Indeed, membrane lipidic environment gains a growing relevance, since there is an increasing knowledge on how lipidic membrane changes can disturb membrane properties thereby affecting several cellular functions.

In this work, liposomes (as membrane models) and several techniques are used to study drug-membrane interactions of two β -blockers.

The goals are to clarify some aspects about the distribution of these drugs (using derivative fluorescence spectroscopy to determine partition coefficient) and to determine the direct and indirect effects of β -blockers on physical-chemical properties of membrane models. The changes in membrane biophysics induced by the drugs were studied by steady-state fluorescence anisotropy.

Studies were performed to evaluate membrane binding, using fluorescence methods with ANS probe, and dynamic light scattering was used to find out the effect of these drugs in liposomes size and charge (by means of zeta potential determination). Gathering the information, given by all these techniques, allowed to propose membrane location of the drugs studied.

With these studies it was possible to conclude that cardiovascular drugs interact with the bilayer, as they present high membrane partition, membrane fluidizing effect and demonstrate membrane charge changes. These effects can be related to their pharmacologic effects.

Keywords: β -blockers; liposomes; drug-membrane interaction; biophysical techniques.

Índice

Abreviaturas e símbolos	XIX
I. Introdução.....	24
1. Motivação da Dissertação e Objectivo Geral	24
2. Objectivos específicos	28
3. Organização da dissertação	29
II. Enquadramento teórico	31
1. Membranas biológicas.....	31
1.1 As membranas são fundamentais para a vida	31
1.2 As membranas contêm um grande número de lípidos.....	33
1.3 Aspectos da biofísica membranar condicionados pelo polimorfismo lipídico ..	35
2. Modelos membranares	40
2.1 Lipossomas.....	43
3. Fármacos cardiovasculares estudados.....	52
3.1 Propranolol	54
3.2 Acebutolol	55
4. Sondas de fluorescência usadas nos estudos biofísicos membranares.....	58
4.1 Sonda DPH.....	61
4.2 Sonda TMA-DPH.....	63
4.3 Sonda ANS	65
III. Técnicas biofísicas para análise da interacção dos fármacos cardiovasculares com as membranas	67
1. Determinação do coeficiente de partição por espectrofluorimetria e espectrofotometria derivativa.....	67
1.1 Definição e necessidade de determinação deste parâmetro	67
1.2 Sistemas octanol/água e lípido/água.....	70
1.3 Métodos utilizados na determinação do coeficiente de partição.....	72

2.	Avaliação da microviscosidade, cooperatividade e ordem por anisotropia em estado estacionário	80
2.1	Fluidez membranar.....	80
2.2	Anisotropia de fluorescência em estado estacionário	83
3.	Avaliação da ligação à membrana por estudos de fluorescência com a sonda ANS.	88
4.	Avaliação do efeito no tamanho e na carga membranar por determinação do potencial zeta por dispersão de luz dinâmica	91
IV.	Métodos experimentais e resultados.....	95
1	Preparação dos lipossomas unilamelares	95
2	Estudos prévios dos fármacos	98
2.1	Propranolol	98
2.2	Acebutolol	102
3	Determinação do coeficiente de partição (K_p) nos sistemas lipossoma/água.....	107
3.1	Condições experimentais	107
3.2	Resultados.....	108
3.3	Conclusões	115
4	Avaliação da perturbação da microviscosidade, ordem e cooperatividade da membrana	118
4.1	Condições experimentais	118
4.2	Resultados.....	119
4.3	Conclusões	126
5.	Avaliação da ligação à membrana por estudos de fluorescência com sonda ANS....	128
5.1	Condições experimentais	128
5.2	Resultados.....	129
5.3	Conclusões	136
6.	Avaliação do efeito no tamanho e na carga membranar por determinação do potencial zeta por dispersão de luz dinâmica	137
6.1	Condições experimentais	137

6.2	Resultados.....	138
6.3	Conclusões.....	139
7.	Previsão da localização preferencial dos fármacos ao nível da membrana por integração dos dados obtidos pelas diferentes técnicas.....	140
V.	Conclusões e perspectivas futuras	143
VI.	Bibliografia	147

Índice de figuras

Figura 1 - Esquema representativo das várias possibilidades de contaminação ambiental com fármacos de uso humano durante a sua produção, uso e eliminação. Adaptado de (5).....	27
Figura 2 - Interior de uma célula eucariótica com os vários compartimentos celulares delimitados por membranas. Adaptado de (18).....	32
Figura 3 - Esquema representativo da membrana plasmática.....	34
Figura 4 – (A) Ilustração da estrutura membranar constituída por uma bicamada de fosfolípidos e (B) Estrutura de uma molécula de fosfolípido. Adaptado de (27).....	35
Figura 5 - Formas de agregação mais comuns dos fosfolípidos.....	36
Figura 6 - Dependência das transições de fase dos agregados lípido-água com a hidratação, temperatura e o tamanho das cadeias de ácidos gordos dos fosfolípidos (adaptado de (33)). L_c corresponde à fase lamelar cristalina; $L_{\beta'}$ corresponde à fase lamelar gel; $P_{\beta'}$ corresponde à fase lamelar com ondulação periódica; L_{α} corresponde à fase lamelar fluida; H_I é a fase hexagonal e H_{II} é a fase hexagonal invertida; M é a fase micelar e Q é a fase cúbica.....	37
Figura 7 - Transições de fase existentes nas fosfatidilcolinas em que entre a fase gel e fluida existe um estado intermediário com ondulação periódica.....	38
Figura 8 - Representação esquemática da organização dos fosfolípidos numa vesícula lipídica (lipossoma).....	43
Figura 9 – Esquema representativo dos diferentes modelos membranares e sua classificação: MLV (<i>large multilamellar vesicles</i>); LUV (<i>large unilamellar vesicles</i>); SUV (<i>small unilamellar vesicles</i>); GUV (<i>giant unilamellar vesicles</i>); LOV (<i>large oligolamellar vesicles</i>); MVL (<i>multivesicular liposomes</i>). A cinza está representado o conteúdo aquoso nas vesículas. Adaptado de (42).....	46
Figura 10 – Esquema das diferentes técnicas que permitem a obtenção de vesículas unilamelares. Adaptado de (42).....	47
Figura 11 – Estrutura e características da fosfatidilcolina de gema de ovo (EPC). Adaptado de (53).....	49
Figura 12 - Estrutura e características da dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC). Adaptado de (53).....	50
Figura 13 – Estrutura do isoproterenol. Adaptado de (69).....	52
Figura 14 - Estrutura química da sonda 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno. A estrutura foi desenhada usando o software MarvinSketch 5.3.1 desenvolvido pela Chemaxon™.....	62

Figura 15 – Representação esquemática da localização da sonda de fluorescência no interior hidrofóbico de bicamadas de lipossomas multilamelares e de vesículas pequenas. Adaptado de (82).	63
Figura 16 - Estrutura química da sonda 1-(4-trimetilamoniofenil)-6-fenil-1,3,5-hexatrieno. A estrutura foi desenhada usando o software MarvinSketch 5.3.1 desenvolvido pela Chemaxon™.	64
Figura 17 – Estrutura química da sonda ácido 8-anilino-1-naftalenosulfónico (ANS). A estrutura foi desenhada usando o software MarvinSketch 5.3.1 desenvolvido pela Chemaxon™.	65
Figura 18- Diagrama esquemático das localizações propostas para as sondas DPH, TMA-DPH e ANS. As linhas quebradas representam tipos de movimentos possíveis.	66
Figura 19 – Esquema descritivo das barreiras que condicionam a chegada dos fármacos ao local alvo da sua acção terapêutica. Adaptado de (94, 95).....	67
Figura 20 – Representação esquemática do transporte de fármacos através da membrana.....	68
Figura 21 – Possíveis localizações do fármaco num modelo membranar lipídico de acordo com as suas características de solubilidade e permeabilidade. Adaptado de (101).	69
Figura 22 – Representação esquemática da determinação dos coeficientes de partição de um fármaco em sistemas bifásicos.	71
Figura 23 – Representação esquemática das diferenças entre a determinação do coeficiente de partição octanol/água e lípido/água em função da lipofilia dos fármacos em estudo.	72
Figura 24 - Espectros de absorção (superior) e espectros de primeira (inferior esquerda) e segunda (inferior direita) derivadas de suspensões de lipossomas de concentrações crescentes. É visível que o espectro de segunda derivada anula a dispersão da luz causada pelos lipossomas.	76
Figura 25 - Representação esquemática do fenómeno de emissão de fluorescência, em que a intensidade de luz absorvida (I_A) resultará em luz emitida (I_F)......	77
Figura 26 - Esquema representativo dos movimentos lipídicos na membrana.	81
Figura 27 - Princípio da excitação fotoselectiva de fluoróforos excitados por luz polarizada. Adaptado de (80).	84
Figura 28 – Curvas de perfil sigmóide representando em A a forma de determinação dos parâmetros r_{s1} , p_1 e r_{s2} e p_2 , correspondentes, respectivamente, à recta inicial antes da transição de fase e à recta final depois da transição de fase. Após determinação destes parâmetros, na Figura B, é mostrado o ajuste não linear de acordo com a Equação 13 refinando os parâmetros T_m e cooperatividade (B)......	86

Figura 29 – Representação esquemática dos perfis de adsorção da sonda ANS à membrana de lipossomas obtidos na ausência (círculos brancos) e presença de um fármaco (círculos a preto) que compete para os mesmos locais de ligação da sonda à membrana. A cinza são representadas as zonas lineares dos perfis de adsorção cujo declive permite determinar os coeficientes de emissão. $C_{m\acute{a}x}$ representa a intensidade máxima de fluorescência correspondente à concentração máxima de sonda ligada à membrana.....	89
Figura 30 - Representação da dupla camada eléctrica e da variação do potencial zeta com a distância de uma partícula carregada negativamente.	92
Figura 31 – Esquema representativo da preparação de LUVs. (1) Evaporação dos solventes; (2) Filme lipídico seco (obtenção de lamelas); (3) Hidratação do filme lipídico; (4) Agitação mecânica; (5) Obtenção de MLVs; (6) Extrusão; (7) Obtenção de LUVs.	97
Figura 32 - Estrutura química planar e respectiva projecção tridimensional do propranolol (1-(isopropilamina(-3-(naftaleno-1-iloxi) propano-2-ol)))......	98
Figura 33 - Distribuição das microespécies de propranolol a pH 7,4.....	99
Figura 34 – Espectros de Absorção UV-Vis de padrões de propranolol com concentrações (μM): 4 (1); 22 (2); 61 (3); 76 (4); 85 (5); 108 (6).	100
Figura 35 – Zona linear da lei de Lambert-Beer para o $\lambda_{m\acute{a}x}$ de 289 (A) e 319 (B) nm para padrões de propranolol com concentrações (μM): 4 (1); 22 (2); 61 (3); 76 (4); 85 (5); 108 (6).	100
Figura 36 – Espectros de excitação (A) e emissão (B) de fluorescência de padrões de propranolol com concentrações (μM): 0 (1); 1,35 (2); 2,7 (3); 5,4 (4); 6,48 (5); 8,1 (6); 10,8 (7); 13,5 (8); 15,12 (9); 16,2 (10).	101
Figura 37 - Zona linear da lei de Lambert-Beer para o $\lambda_{m\acute{a}x}$ de 350 nm para padrões de propranolol com concentrações (μM): 0 (1); 1,35 (2); 2,7 (3); 5,4 (4); 6,48 (5); 8,1 (6); 10,8 (7); 13,5 (8); 15,12 (9); 16,2 (10).	101
Figura 38 – I) Espectros de excitação de fluorescência do propranolol (A) e da sonda (B), e espectro de emissão de fluorescência da sonda (C). II) Emissão de fluorescência do propranolol quando a excitação é feita ao $\lambda_{m\acute{a}x}$ de excitação da sonda (360 nm).....	102
Figura 39 - Estrutura química planar e respectiva projecção tridimensional do acebutolol (N-[3-acetil-4-(2-hidroxi-3-propan-2-ilamino-propoxi)- fenil]butanamida).	103
Figura 40 - Distribuição das microespécies de acebutolol a pH 7,4.	104
Figura 41 - Espectros de Absorção UV de padrões de acebutolol com concentrações (μM): 100 (1); 150 (2); 200 (3); 250 (4); 300 (5); 400 (6).	104
Figura 42 - Zona linear da lei de Lambert-Beer para o $\lambda_{m\acute{a}x}$ de 320 nm para padrões de acebutolol com concentrações (μM): 100 (1); 150 (2); 200 (3); 250 (4); 300 (5); 400 (6).	105

Figura 43 – Espectros de excitação (A) e emissão (B) de fluorescência de padrões de acebutolol com concentrações (μM): 10 (1); 20 (2); 30 (3); 40 (4); 50 (5); 60 (6).....	106
Figura 44 - Zona linear da lei de Lambert-Beer para o $\lambda_{\text{máx}}$ de 466 nm para padrões de acebutolol com concentrações (μM): 10 (1); 20 (2); 30 (3); 40 (4); 50 (5); 60 (6).....	106
Figura 45 - Espectros de emissão de fluorescência (A) e espectros de 1ª Derivada (B) de suspensões de lipossomas LUVs de EPC em tampão HEPES (pH 7,4 e $I=0,1$), de concentrações (μM): 50 (1), 100 (2), 200 (3), 300 (4), 400 (5), 500 (6), 600 (7), 700 (8), 800 (9), 900 (10), 1000 (11).	109
Figura 46 – Espectros de emissão de fluorescência (A) e respectivos espectros resultantes após a subtracção das referências (B) de amostras de propranolol (10,4 μM) preparadas em tampão HEPES (pH 7,4, $I =0,1$) na presença de concentrações crescentes de LUVs de EPC (μM): 0 (1), 50 (2), 100 (3), 200 (4), 300 (5), 400 (6), 500 (7), 600 (8), 700 (9), 800 (10), 900 (11), 1000 (12). I representa um ponto isobéstico. II representa a linha de base correspondente à dispersão de luz que é eliminada em B, após a subtracção da contribuição relativa às referências.....	110
Figura 47 - Espectros de excitação de fluorescência (A) e respectivos espectros resultantes após a subtracção das referências (B) de amostras de propranolol (10,4 μM) preparadas em tampão HEPES (pH 7,4, $I =0,1$) na presença de concentrações crescentes de LUVs de EPC (μM): 0 (1), 50 (2), 100 (3), 200 (4), 300 (5), 400 (6), 500 (7), 600 (8), 700 (9), 800 (10), 900 (11), 1000 (12). II representa um ponto isobéstico. III representa o desvio batocrómico.	111
Figura 48 – Ajustes, pelo método de regressão não linear da Equação 9, aos dados experimentais de excitação (A) e emissão (B) corrigidos com a subtracção das referências.	112
Figura 49 – Espectros de 1ª Derivada (A) e 2ª Derivada (B) de suspensões de lipossomas LUVs de EPC em tampão HEPES (pH 7,4 e $I=0,1$), de concentrações (μM): 50 (1); 100 (2); 200 (3); 300 (4); 400 (5); 500 (6); 700 (7); 900 (8).	113
Figura 50 – 1ª Derivada dos espectros de excitação (A) e emissão (B) de fluorescência de amostras de acebutolol (40 μM) preparadas em tampão HEPES (pH 7,4; $I=0,1$) na presença de concentrações crescentes de LUVs de EPC (μM): 0 (1); 50 (2); 100 (3); 200 (4); 300 (5); 400 (6); 500 (7); 700 (8); 900 (9). I indica a existência de pontos isobésticos. II indica o mínimo ao qual se efectua a determinação do coeficiente de partição.....	114
Figura 51 – Ajustes, pelo método de regressão não linear da Equação 10 aos dados experimentais da 1ª derivada de excitação (A) e emissão (B) corrigidos com a subtracção das referências.	115
Figura 52 – Anisotropia de estado estacionário da sonda DPH (A) e TMA-DPH (B) na ausência (círculo a preto) e na presença de propranolol adicionado por incubação (círculo	

cinza) e por inclusão (círculo branco), medida em função da temperatura. Cada ponto corresponde a um valor médio \pm desvio padrão de pelo menos 3 ensaios e as linhas são o melhor ajuste obtido de acordo com a Equação 13.	120
Figura 53 – Efeito do propranolol na temperatura de transição de fase dos LUVs de DPPC (linha a tracejado refere-se ao valor médio da T_m na ausência de fármaco) marcados com TMA-DPH (a cinza escuro) e DPH (a cinza claro).....	122
Figura 54 – Anisotropia de estado estacionário da sonda DPH (A) e TMA-DPH (B) na ausência (círculo a preto) e na presença de acebutolol adicionado por incubação (círculo cinza) e por inclusão (círculo branco), medida em função da temperatura. Cada ponto corresponde a um valor médio \pm desvio padrão de pelo menos 3 ensaios e as linhas são o melhor ajuste obtido de acordo com a equação Equação 13.	124
Figura 55 – Intensidade de fluorescência em função da concentração de ANS adsorvida a lipossomas de DPPC (50 μ M) na ausência (B) e na presença de concentrações crescentes de propranolol (μ M): 2,7 (1); 5,4 (2); 8,1 (3); 10,8 (4); 13,5 (5). Em (II) detalhe da zona a tracejado do gráfico (I). Os resultados apresentados correspondem à média \pm desvio padrão de 3 ensaios independentes e as linhas são o melhor ajuste obtido de acordo com a Equação 16.....	130
Figura 56 – Intensidade de fluorescência em função da concentração de ANS adsorvida a lipossomas de DPPC (50 μ M) na ausência (B) e na presença de concentrações crescentes de acebutolol (μ M): 10 (1); 20 (2); 30 (3); 40 (4); 50 (5); 60 (6). Os resultados apresentados correspondem à média \pm desvio padrão de 3 ensaios independentes e as linhas são o melhor ajuste obtido de acordo com a Equação 16.....	134
Figura 57 – Valores do potencial zeta (quadrados) e do tamanho (círculos) de vesículas de LUVs de EPC para concentrações crescentes de propranolol (símbolos a branco) (μ M): 0; 18; 36; 45; 89; 178; 268; 312; e de acebutolol (símbolos a preto) (μ M): 0; 9; 17; 34; 43; 51; 64; 86; 129; 172; 257; 343; 515. Os valores apresentados correspondem ao valor médio \pm desvio padrão para, pelo menos, 3 determinações, em dois ensaios independentes.	138
Figura 58 – Representação esquemática da proposta de localização membranar do acebutolol (A) e propranolol (B).	142

Índice de tabelas

Tabela 1 – Comparação das características físicas das bicamadas lipídicas artificiais e as membranas biológicas (1).	41
Tabela 2 – Comparação de modelos membranares. Adaptado de (40).	42
Tabela 3- Distribuição dos receptores β no organismo e principal acção resultante da sua activação. Adaptado de (67).....	53
Tabela 4 - Especialidades farmacêuticas que contêm propranolol e acebutolol disponíveis no mercado português. Adaptado de (71).	56
Tabela 5 – Resumo das características farmacológicas do propranolol e acebutolol. Adaptado de (67).	57
Tabela 6 – Propriedades físico-químicas do propranolol. Os valores em a) foram obtidos na literatura (136); em b) obtido por cálculo através de um programa Marvin sketch calculator da Chemaxon TM ; e em c) foram obtidos na literatura (137).	99
Tabela 7- Propriedades físico-químicas do acebutolol. Os valores em: a) foram obtidos a partir da literatura (138); b) valor calculado através de um programa Marvin sketch calculator da Chemaxon TM ; e c) valor obtido na literatura (139).	103
Tabela 8 – Comparação dos valores de Partição do Propranolol. a) Valor calculado através de um programa Marvin sketch calculator da Chemaxon TM ; b) Valor descrito na literatura (137).....	116
Tabela 9 – Comparação dos valores de Partição do Acebutolol. a) Valor calculado através de um programa Marvin sketch calculator da Chemaxon TM ; b) Valor descrito na literatura (142).....	117
Tabela 10 – Parâmetros biofísicos T_m , B e S calculados para LUVs de DPPC marcados com TMA-DPH e DPH, na ausência e na presença de concentrações crescentes de propranolol.	123
Tabela 11 - Parâmetros biofísicos T_m , B e S calculados para LUVs de DPPC marcados com TMA-DPH e DPH na ausência e na presença de concentrações crescentes de acebutolol.....	125
Tabela 12 – Valores dos Coeficientes de Emissão obtidos na ausência e na presença de concentrações crescentes de Propranolol.	129
Tabela 13 – Parâmetros de associação da sonda ANS à membrana (LUVs de DPPC) obtidos por ajuste dos dados experimentais na ausência e presença de concentrações crescentes de propranolol à Equação 16. $C_{m\acute{a}x}$ é a intensidade máxima de fluorescência (relacionada com a concentração máxima de sonda ligada à membrana); K é a constante de dissociação da sonda à membrana; e b é a cooperatividade do processo de ligação da	

sonda ANS à membrana. Os valores apresentados correspondem à média \pm desvio padrão de pelo menos 3 ensaios independentes.	131
Tabela 14 – Influência de concentrações crescentes de propranolol no potencial de superfície membranar, ψ (mV), calculado para a membrana lipídica (LUVs de DPPC) através da Equação 17. Os valores apresentados correspondem à média \pm desvio padrão de pelo menos 3 ensaios independentes.....	132
Tabela 15 - Valores dos coeficientes de emissão obtidos na ausência e na presença de concentrações crescentes de acebutolol. Os valores apresentados correspondem à média \pm desvio padrão de pelo menos 3 ensaios independentes.....	133
Tabela 16 - Parâmetros de associação da sonda ANS à membrana (LUVs de DPPC) obtidos por ajuste dos dados experimentais na ausência e presença de concentrações crescentes de acebutolol à Equação 16. $C_{m\acute{a}x}$ é a intensidade máxima de fluorescência (relacionada com a concentração máxima de sonda ligada à membrana); K é a constante de dissociação da sonda à membrana e b é a cooperatividade do processo de ligação da sonda ANS à membrana. Os valores apresentados correspondem à média \pm desvio padrão de pelo menos 3 ensaios independentes.	134
Tabela 17 - Influência de concentrações crescentes de acebutolol no potencial de superfície membranar, ψ (mV), calculado para a membrana lipídica (LUVs de DPPC) através da Equação 17. Os valores apresentados correspondem à média \pm desvio padrão de pelo menos 3 ensaios independentes.....	135

Índice de equações

$r = \frac{r_0}{1 + (\tau/\theta)}$	Equação 1	60
$r = \frac{(r_0 - r_\infty) \times \theta}{\theta + \tau} + r_\infty$	Equação 2	60
$\theta = \frac{\bar{\eta} \times V}{RT}$	Equação 3	60
$K_p = \frac{[A]_{\text{orgânica}}}{[A]_{\text{aquosa}}}$	Equação 4	69
$Abs_T = Abs_a + \frac{(Abs_m - Abs_a)K_p [L]V_\phi}{1 + K_p [L]V_\phi}$	Equação 5	74
$D = D_a + \frac{(D_m - D_a)K_p [L]V_\phi}{1 + K_p [L]V_\phi}$	Equação 6	76
$D = \frac{\delta^n Abs}{\delta^n \lambda}$	Equação 7	76
$\phi = \frac{I_F}{I_A}$	Equação 8	78
$I_T = I_a + \frac{(I_m - I_a)K_p [L]V_\phi}{1 + K_p [L]V_\phi}$	Equação 9	78
$D = \frac{\delta^n I}{\delta^n \lambda}$	Equação 10	79
$r_{ss} = \frac{I_{\parallel} - GI_{\perp}}{I_{\parallel} + 2GI_{\perp}}$	Equação 11	83
$G = \frac{I_{\perp}}{I_{\parallel}}$	Equação 12	83
$r_{ss} = r_{s1} + p_1 T + \frac{r_{s2} - r_{s1} + p_2 T - p_1 T}{1 + 10^{B(1/T - 1/T_m)}}$	Equação 13	85
$r_\infty = 4/3 r_{ss} - 0,10$	Equação 14	86
$S = \sqrt{r_\infty / r_0}$	Equação 15	86
$[ANS]_B = C_{\text{máx}} \frac{(K[ANS]_\infty)^b}{1 + (K[ANS]_\infty)^b}$	Equação 16	90

$\Delta\Psi = \frac{RT}{F} \ln\left(\frac{K'_{app}}{K_{app}}\right)$	Equação 17	90
$\xi = \frac{3\eta u}{2\varepsilon_0\varepsilon_r f(\kappa a)}$	Equação 18	92
$R_H = \frac{kT}{6\pi\eta D}$	Equação 19	93

Abreviaturas e símbolos

AINES	anti-inflamatórios não esteróides
ANS	ácido 8-anilino-1-naftalenosulfónico
BLM	bicamadas planares
CMC	concentração micelar crítica
DLS	dispersão de luz dinâmica (<i>dynamic light scattering</i>)
DPH	1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
DMPC	1,2-dimiristoilfosfatidilcolina
DPPC	1,2-dipalmitoilfosfatidilcolina
e.g.	por exemplo
EPC	fosfatidilcolina de gema de ovo
etc.	et cetera
GUV	vesículas unilamelares gigantes (<i>giant unilamellar vesicles</i>)
H _I	fase hexagonal do tipo I
H _{II}	fase hexagonal do tipo II
HDL	lipoproteínas de elevada densidade (high density lipoproteins)
K _p	coeficiente de partição
K _{pO/A}	coeficiente de partição octanol/água
K _{pL/A}	coeficiente de partição lípido/água
L _α	fase líquido-cristalina ou fluida
L _β	fase sólido-cristalina ou gel lamelar (sem inclinação das cadeias)
L _{β'}	fase sólido-cristalina ou gel lamelar (com inclinação das cadeias)
L _c	fase lamelar cristalina

LOV	vesículas oligolamelares grandes (<i>large oligolamellar vesicles</i>)
LUV	vesículas unilamelares grandes (<i>large unilamellar vesicles</i>)
M	micelas
MDR	resistência a múltiplos fármacos (<i>multi-drug resistance</i>)
MLV	vesículas multilamelares grandes (<i>large multilamellar vesicles</i>)
MVL	lipossomas multivesiculares (<i>multivesicular liposomes</i>)
<i>n</i> -As	ácido (+) – <i>n</i> - (9-antroiloxi)-esteárico
P-gp	P-glicoproteína
P_{β}	fase sólido-cristalina ou gel com ondulação periódica
Q_{II}	agregados do tipo cúbico
<i>r</i>	anisotropia de fluorescência
SUV	vesículas unilamelares pequenas (<i>small unilamellar vesicles</i>)
TMA-DPH	1-(4-trimetilamoniofenil)-6-fenil-1,3,5-hexatrieno
T_m	temperatura de transição de fase principal
T_p	temperatura de pré-transição de fase
T_s	temperatura de subtransição de fase
UV-Vis	ultravioleta-visível
VIH	vírus da imunodeficiência humana
VLDL	lipoproteínas de densidade muito baixa (<i>very low density lipoproteins</i>)
ϵ	absortividade molar
$\lambda_{m\acute{a}x}$	comprimento de onda de absorção máximo
r_0	anisotropia fundamental
θ	tempo de correlação rotacional
τ	tempo de semi-vida de fluorescência

r_{∞}	limitação que o ambiente local do fluoróforo impõe à extensão da rotação da sonda
$\bar{\eta}$	microviscosidade
T	temperatura absoluta
R	constante dos gases perfeitos
V	volume da unidade rotacional
$[A]_{\text{orgânica}}$	concentração de uma substância A na fase orgânica
$[A]_{\text{aquosa}}$	concentração de uma substância A na fase aquosa
Abs_T	absorvância do composto total
Abs_a	absorvância do composto em água
Abs_m	absorvância do composto em lípido
[L]	concentração de lípido
V_{φ}	volume molar lipídico
D	derivada de espectros
I_A	número de fótons absorvidos pelo fluoróforo
I_F	número de fótons emitidos
I_T	intensidade de emissão de fluorescência do composto total
I_a	intensidade de emissão de fluorescência do composto em água
I_m	intensidade de emissão de fluorescência do composto em lípido
r_{ss}	anisotropia de fluorescência em estado estacionário
I_{\parallel}	intensidade de fluorescência medida com o polarizador analisador orientado paralelamente
I_{\perp}	intensidade de fluorescência medida com o polarizador analisador orientado perpendicularmente

G	factor de correcção instrumental
r_{s1}	ordenada na origem da recta obtida no patamar inicial
r_{s2}	ordenada na origem da recta obtida no patamar final
p_1	declive da recta obtida no patamar inicial
p_2	declive da recta obtida no patamar final
B	cooperatividade
S	ordem
$[ANS]_B$	concentração de ANS ligada
$[ANS]_{\infty}$	concentração de ANS livre
$C_{m\acute{a}x}$	concentração máxima de sonda ligada aos lipossomas
K	constante de dissociação
b	cooperatividade
$\Delta\Psi$	variação do potencial
F	constante de Faraday
K'_{app}	constante aparente de ligação da sonda à membrana na presença de fármaco
K_{app}	constante aparente de ligação da sonda à membrana na ausência de fármaco
ξ	potencial zeta
η	viscosidade do meio
u	mobilidade
ϵ_0	permitividade do espaço livre
ϵ_r	constante dieléctrica do meio
κ	parâmetro de Debye

a	raio do lipossoma
k	constante de Boltzmann
η	viscosidade
D	coeficiente de difusão translacional
R_H	raio hidrodinâmico
I_0	número de fótons incidentes
Φ	rendimento quântico

I. Introdução

1. Motivação da Dissertação e Objectivo Geral

Como é do domínio geral, e ao efectuar-se uma retrospectiva, é possível, sem dificuldade, observar uma rápida evolução da Indústria Farmacêutica, necessariamente impulsionada pelo crescente conhecimento tanto dos fármacos como das patologias a que eles se destinam. É também consensual que, para o cidadão, a existência de uma panóplia de princípios activos é fundamental, já que ao longo da vida é quase forçosa a utilização de fármacos como meios de prevenção, tratamento ou diagnóstico. Torna-se, portanto, fácil de compreender a necessidade de obter fármacos com qualidade, dado que, normalmente, são necessárias baixas quantidades de fármaco para que se produza o seu efeito terapêutico, e de um ligeiro aumento na dose administrada podem ocorrer efeitos tóxicos. Além disso, os fármacos são frequentemente administrados a um alargado grupo de pessoas, o que aumenta a responsabilidade em relação ao seu Controlo da Qualidade.

A Indústria Farmacêutica levou ao extremo o Controlo da Qualidade, sendo a referência para muitas outras áreas, pois rege-se sob normas deveras exigentes. A Qualidade pode ser definida como sendo o “conjunto de atributos e características de uma entidade ou produto que determinam a sua aptidão para satisfazer necessidades e expectativas da sociedade” – *in* Decreto de Lei nº140/2004 de 8 de Junho. Neste sentido, a Qualidade não tem uma definição estanque e, por isso, o Controlo da Qualidade corresponde a uma visão integrada e abrangente de todos os aspectos relacionados com a concepção, produção e fornecimento de um produto. Trata-se, então, de acompanhar todo o ciclo de vida de um produto, neste caso, um fármaco, desde a sua concepção até à sua fase final que pode corresponder à retirada ou destruição.

Apesar de o Controlo da Qualidade dos seus produtos ser da responsabilidade da Indústria Farmacêutica acontece, frequentemente, que alguns aspectos relacionados com os fármacos só sejam estudados após a sua introdução no mercado, devido à massificação do seu uso. Daí que seja, também, necessário um maior investimento na Investigação de forma a promover o desenvolvimento de técnicas que possam ser utilizadas no estudo de fármacos. É necessário, por outro lado, que estas técnicas possam ser realizadas *in vitro*, de forma a tornarem-se económicas, simples de executar,

rápidas e fáceis de controlar. Contudo, é forçoso que estas mesmas técnicas forneçam informações que possam ser equiparadas ao que acontece *in vivo* e, para tal, é necessário recriar *in vitro* condições que mimetizem o que acontece no organismo.

Para que os fármacos produzam os seus efeitos têm de interagir com as células e, mais especificamente, com as membranas que as delimitam. A interacção com as membranas é fundamental, já que estas se apresentam como uma barreira que o fármaco tem de ultrapassar, ou contornar, para conseguir chegar ao seu local activo. Assim, os estudos das interacções fármaco-membrana reúnem as condições acima enunciadas, podendo ser desenvolvidos *in vitro* com o recurso a modelos miméticos das membranas biológicas, mas sendo correlacionáveis com as conclusões obtidas *in vivo*. Neste sentido, é possível enunciar uma série de razões para o estudo das interacções dos fármacos com membranas, que se prendem com a importância das informações obtidas nestes estudos, e que vão desde dados importantes para o desenvolvimento de novos fármacos, até à compreensão do mecanismo de acção e efeitos tóxicos de fármacos já utilizados na terapêutica (1).

No que diz respeito ao desenvolvimento de novos fármacos, os estudos das interacções fármaco-membrana permitem prever o que sucede durante as fases farmacocinética e farmacodinâmica dos fármacos, sendo uma ajuda preciosa no *design* de novos fármacos que, através de ensaios de *screening in vitro*, permitem seleccionar as moléculas mais interessantes (com actividade farmacológica e com menos efeitos secundários), reduzindo, assim, os custos de produção (2).

Um fármaco pode ser extremamente potente, contudo, se não chegar ao seu local de acção não terá qualquer efeito. Conhecendo as interacções fármaco-membrana é possível saber se um fármaco pode ou não chegar com facilidade ao local que se pretende e, caso o fármaco não possa ser alterado sem perda de actividade, muitas vezes a solução é veiculá-lo no interior de vesículas lipídicas. Esta opção é também vantajosa nos casos de, por exemplo, neoplasias em que se pretendem administrar fármacos muito agressivos para as células normais, mas que no interior de vectores chegam, preferencialmente, às células tumorais (3).

A interacção fármaco-membrana permite igualmente clarificar quer os efeitos terapêuticos, quer os efeitos tóxicos de um fármaco. É desta interacção que o fármaco produz o seu efeito, por ligação a receptores localizados na membrana ou no interior celular, ou por alteração das propriedades biofísicas da membrana. Muitos dos efeitos tóxicos surgem, também, devido à modificação destas propriedades biofísicas das

biomembranas (1). A utilização de ensaios *in vitro* permite saber um pouco mais sobre como se processam estas alterações.

Por outro lado, sabendo de que forma o mecanismo de acção do fármaco está relacionado com a interacção deste com a membrana biológica, é possível estabelecer relações causa-efeito entre as características físico-químicas dos compostos e a sua actividade farmacológica. Esta contribuição para o estabelecimento de relações estrutura-actividade permite o desenho de novas moléculas com maior eficácia terapêutica e menores efeitos secundários (1).

As biomembranas são componentes celulares comuns a todos os sistemas vivos, por isso, não é de estranhar que fármacos de uso humano possam afectar outras espécies. A importância das interacções com as membranas na compreensão dos efeitos tóxicos dos fármacos tem vindo a ser estudada, surgindo novas áreas de estudo, como a avaliação da toxicidade membranar, que defende que os efeitos citotóxicos de uma variedade de fármacos e poluentes parecem resultar da sua incorporação na bicamada lipídica e surgir como consequência da sua capacidade de afectar e modular as propriedades físicas da membrana (4). A eliminação incorrecta de fármacos, bem como o facto de os seus metabolitos, resultantes da sua passagem pelo organismo humano, serem lançados nas redes de esgotos, tornaram-se um grave problema ambiental para o qual só recentemente se tem dado atenção (Figura 1). Produzir fármacos com Qualidade é, também, produzir fármacos seguros para o ambiente, logo, é necessário perceber quais os possíveis efeitos dos fármacos nos seres vivos que, acidentalmente, são expostos a estes e perceber quais as formas de tratamento de resíduos para evitar danos ecológicos.

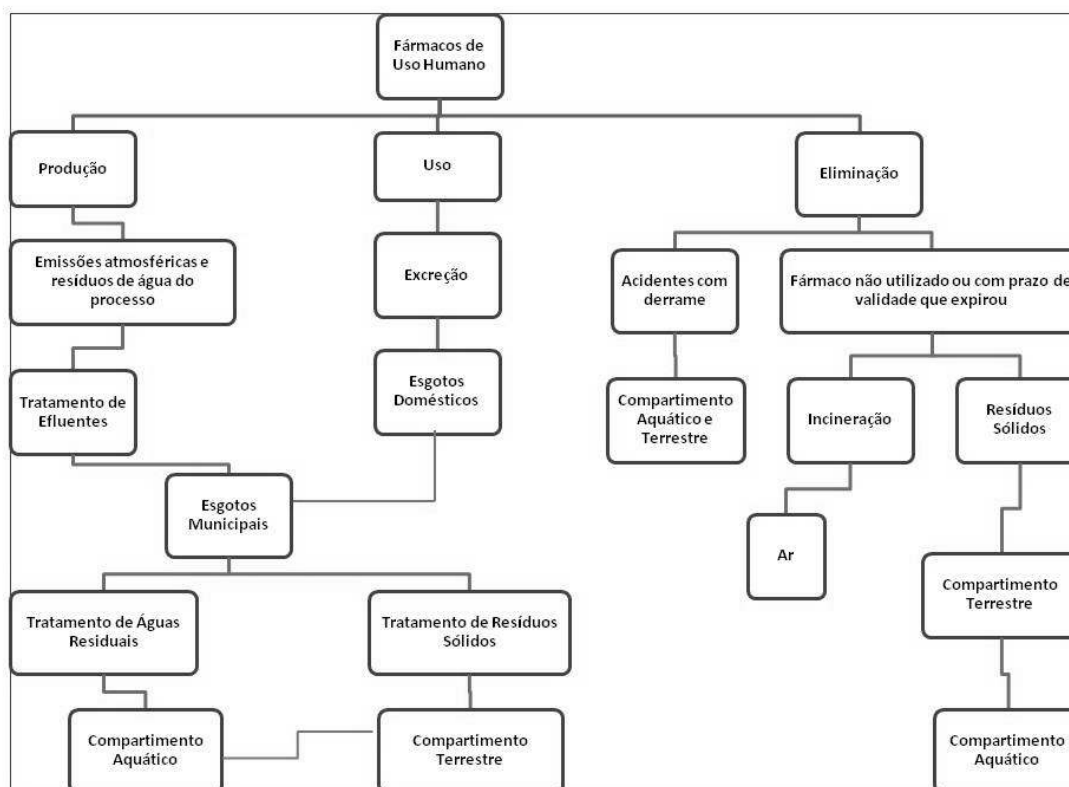


Figura 1 - Esquema representativo das várias possibilidades de contaminação ambiental com fármacos de uso humano durante a sua produção, uso e eliminação. Adaptado de (5).

Os estudos de interação fármaco-membrana são também usados para avaliar os mecanismos de resistência a múltiplos fármacos (MDR). O termo deriva da designação anglo-saxónica **multi-drug resistance** – **MDR** – e é usado para descrever a capacidade que as células apresentam, quando expostas a um único fármaco, de desenvolver resistência a um largo espectro de fármacos estrutural e funcionalmente diferentes (6). Este tipo de resistências pode ser verificado em células cancerígenas, em bactérias e em leveduras. Em qualquer um destes casos, a MDR constitui um obstáculo fundamental à eficácia da quimioterapia. Há vários mecanismos envolvidos no desenvolvimento da MDR, entre os quais se encontra a expressão aumentada de uma proteína transmembranar designada por P-glicoproteína (P-gp). A P-gp é uma proteína que modula a absorção, biodisponibilidade, acumulação nos tecidos e excreção dos fármacos. Assim, esta proteína tem um papel determinante na resistência celular ao tratamento por anti-retrovirais e anti-cancerígenos, uma vez que, quando expressa, determina a expulsão destes fármacos para o exterior celular (7-12). Recentemente, tem-

se verificado que é possível modular o funcionamento da P-gp através da alteração da fluidez e permeabilidade da membrana onde esta proteína se encontra inserida. Os estudos de interacção fármaco-membrana possibilitam, então, a descoberta de moduladores da P-gp, permitindo, assim, minorar os mecanismos de multi-resistência (1).

O efeito dos fármacos na biofísica membranar pode condicionar a actividade das enzimas que, por sua vez, alteram funções celulares. De facto, há evidências crescentes de que a estrutura e a dinâmica da bicamada lipídica desempenham um papel fundamental na funcionalidade membranar, pela perturbação indirecta da função das proteínas (13). Assim, a perturbação lipídica induzida por fármacos pode levar a alterações de muitas propriedades membranares que, por sua vez, conduzirão a alterações do desempenho de enzimas e receptores. Consequentemente, para além das interacções específicas entre os fármacos e as enzimas, a inibição enzimática pode ser, também, resultado de modificações das propriedades biofísicas membranares (1).

Uma outra importante razão para o estudo das interacções fármaco-membrana é o facto de a membrana exercer funções na sinalização celular. Ora, fármacos que interfiram com a membrana podem, também, interferir com a sinalização celular, sendo esta uma área a desenvolver, já que a sinalização celular condiciona várias funções celulares, incluindo a expressão génica (1).

Das razões atrás enunciadas percebe-se a importância do estudo das interacções fármaco-membrana, que motivaram um estudo aplicado ao grupo terapêutico dos β -bloqueadores, fármacos com acção cardiovascular. Grupo, este, escolhido dada a sua elevada importância, tendo em conta a sua vasta utilização e relevância na clínica. Assim, o objectivo geral desta dissertação passa por uma abordagem lipidómica do estudo do mecanismo de acção de fármacos, pois centra-se no efeito destes nos componentes lipídicos da membrana, tentando relacionar os efeitos biofísicos membranares com os efeitos terapêuticos e tóxicos do fármaco.

2. Objectivos específicos

Dentro do objectivo geral do estudo da interacção de fármacos cardiovasculares com a membrana, delinearam-se alguns objectivos específicos que contemplam:

1- A escolha de um modelo membranar adequado à mimetização das membranas biológicas;

- 2- A determinação da distribuição dos fármacos estudados entre um meio membranar e aquoso, através da avaliação do coeficiente de partição;
- 3- A avaliação dos efeitos dos fármacos estudados nas propriedades biofísicas membranares, através de estudos de alteração da microviscosidade, cooperatividade e ordem lipídica;
- 4- A avaliação da ligação dos fármacos estudados à superfície membranar e consequente efeito na carga da membrana, através de estudos de potencial zeta e ligação a uma sonda fluorescente interfacial;
- 5- A dedução da possível localização membranar dos fármacos estudados, através da análise de todos os resultados recolhidos no âmbito dos objectivos anteriores;
- 6- A correlação das informações obtidas, a partir dos estudos *in vitro* realizados, com algumas informações *in vivo*, descritas para os fármacos estudados.

3. Organização da dissertação

Na tentativa de conseguir um fio condutor coerente, optou-se por organizar esta dissertação em 5 capítulos.

O **Capítulo I** faz uma **Introdução** da dissertação, incidindo sobre a motivação e objectivo geral deste trabalho. Faz também referência aos objectivos específicos e ao modo como está organizada a dissertação.

No **Capítulo II, Enquadramento teórico**, são abordados os vários temas que permitiram iniciar os estudos de interacção fármaco-membrana. É essencial um conhecimento mais aprofundado da composição e estrutura das **membranas biológicas** e, fundamentalmente, da sua componente lipídica, para se perceber de que forma é que esta pode ser alterada por interacção com o fármaco. Por outro lado, o conhecimento da estrutura e composição da bicamada lipídica vai permitir o desenvolvimento de **modelos membranares**. Esta temática é também abordada neste capítulo, realçando o modelo membranar escolhido para a realização dos trabalhos, os **lipossomas**, focando as suas características químicas, físicas, estruturais e também a sua preparação e caracterização. De seguida faz-se referência ao grupo de **fármacos** estudados, os **β -bloqueadores**, e, mais especificamente, ao **propranolol** e **acebutolol**, acentuando as

características de ambos, bem como os efeitos terapêuticos e secundários. Por fim, é feita uma menção às sondas de fluorescência utilizadas nestes trabalhos.

As **técnicas biofísicas** para a análise da interação dos fármacos com a membrana são referidas no **Capítulo III**. Apresenta-se uma breve explicação teórica das técnicas que permitem a determinação da distribuição do fármaco pela avaliação do coeficiente de partição; o estudo da biofísica membranar, através da avaliação da microviscosidade, cooperatividade e ordem; estudos de ligação à membrana realizados com a sonda ANS e avaliação do efeito do fármaco, quer no tamanho, quer na carga da membrana.

O **Capítulo IV, Métodos Experimentais e Resultados**, expõe a forma de realização dos trabalhos e apresenta os resultados obtidos após a aplicação das diferentes técnicas, permitindo, assim, inferir sobre a localização do fármaco na membrana.

Com os resultados obtidos, tecem-se as **Conclusões** do trabalho, no **Capítulo V**.

Por fim, apresentam-se as **referências bibliográficas** que serviram de suporte teórico a este trabalho.

II. Enquadramento teórico

1. Membranas biológicas

As interações de moléculas farmacologicamente activas com as membranas e a capacidade de permear as bicamadas fosfolipídicas são parâmetros de extrema importância, não só para o estudo do mecanismo de acção de moléculas já desenvolvidas, mas também para o *design* e desenvolvimento de novas moléculas (14).

Dado que se pretende com este trabalho realçar a importância dos estudos das interações fármaco-membrana, faz todo o sentido, numa fase preliminar, rever algumas características que tornam as membranas biológicas estruturas únicas e fundamentais para a vida, pelas várias funções que desempenham. O conhecimento da composição membranar e, em especial, da sua componente lipídica é fundamental para se desenvolverem este tipo de estudos. De facto, a diversidade lipídica confirma o papel fundamental dos lípidos na composição membranar e acaba por determinar, também, a função e localização das membranas biológicas ao nível do organismo. Por outro lado, para compreender o complexo papel da membrana biológica como interface física e química, é necessário tomar conhecimento do rico polimorfismo conferido pelos lípidos que determinam os aspectos biofísicos fundamentais das membranas biológicas. Finalmente, é necessário um conhecimento abrangente sobre a membrana biológica, que permita o desenvolvimento de modelos membranares que a mimetizem o melhor possível.

1.1 As membranas são fundamentais para a vida

Todas as células vivas estão rodeadas por uma ou várias membranas. A membrana define a célula (física e funcionalmente) como uma unidade viva e separa-a do que a rodeia, ou seja, separa o domínio intracelular do extracelular (1, 15, 16). A membrana exerce funções importantes de **regulação do metabolismo celular**, permitindo: a entrada de substratos (passivamente ou por intermédio de proteínas de transporte incluídas na membrana); a eliminação de produtos tóxicos; e a conservação da energia biológica (1, 16, 17). Para além de funcionar como uma **barreira semi-permeável protectora** da célula, a membrana plasmática tem ainda um importante papel na

homeostase celular e no **controlo da pressão osmótica**, que são fundamentais para o bom funcionamento celular (1, 16, 17).

Apesar de ser uma barreira, a membrana não é estanque, já que intervém na **comunicação intercelular** (1, 16, 17). A comunicação entre células pode efectuar-se através de contacto directo por junções membranares, ou indirectamente, via receptores existentes na membrana e através da secreção de compostos químicos que são reconhecidos como sinais por receptores membranares de outras células (1).

A capacidade de **fusão** é outra das propriedades da membrana que é fundamental ao normal funcionamento da célula. Através desta propriedade, a célula é capaz de proceder à **divisão celular**. A fusão permite ainda o **transporte intracelular** de vesículas entre os diferentes organelos intracelulares, bem como os processos de **endocitose** e **exocitose** (1, 16, 17). Também estes organelos intracelulares, tais como os cloroplastos, o núcleo, as mitocôndrias e os peroxissomas são protegidos por membranas (Figura 2).

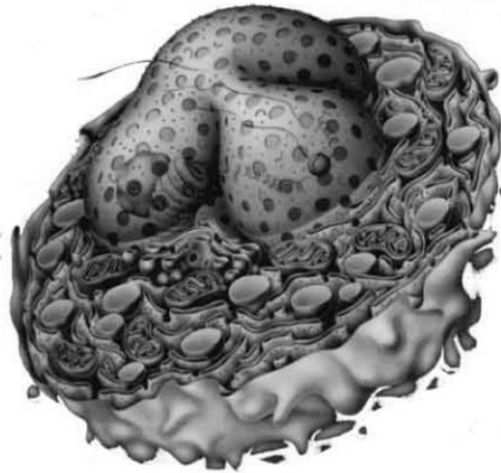


Figura 2 - Interior de uma célula eucariótica com os vários compartimentos celulares delimitados por membranas. Adaptado de (18).

Estas membranas internas têm igualmente importantes funções, sendo responsáveis pela separação de reacções bioquímicas incompatíveis, mantendo o transporte intracelular, e desempenhando um papel fundamental na transferência e armazenamento de energia (1).

Finalmente, uma função de relevo das membranas prende-se com o **controlo da actividade enzimática** (16, 17). Muitas enzimas são proteínas interfaciais que necessitam da interface membranar para poderem actuar (e.g. a fosfolipase). Outras, são

proteínas integrais que se inserem ao nível membranar, cuja actividade está dependente das propriedades biofísicas da membrana (19).

Tendo em conta que as funções atribuídas à membrana são determinadas pela conjugação da composição química, estado físico e organização estrutural, é importante abordar mais pormenorizadamente estes três factores, o que será feito nas secções seguintes.

1.2 As membranas contêm um grande número de lípidos

Apesar da enorme variedade de seres vivos, de tipos de células e de organelos na mesma célula eucariota, é hoje aceite que a unidade básica estrutural de todas as membranas biológicas é a bicamada lipídica. A diversidade dos lípidos existente e a heterogeneidade dos agregados por eles formados limitou, durante muito tempo, o seu estudo, principalmente pela dificuldade de isolar e separar os seus componentes, tendo-se dado mais ênfase à componente proteica das membranas. No entanto, actualmente tem vindo a ser reconhecido o papel fundamental que os lípidos desempenham, apesar da membrana apresentar na sua constituição proteínas e hidratos de carbono. Assim, paralelamente às áreas já desenvolvidas da Proteómica e Genómica começa agora a desenvolver-se a área da Lipidómica (20, 21).

Sendo um constituinte fundamental das membranas biológicas, os lípidos desempenham um papel crucial na manutenção da integridade dos seres vivos. Hoje em dia é conhecida uma grande diversidade de lípidos constituintes da membrana e o aspecto comum por eles apresentado é o facto de terem um **carácter anfifílico**, que os torna solúveis em solventes aquosos (polares) e não-polares (1, 22-24). Esta propriedade dos lípidos membranares determina a formação de bicamadas, por associação dos monómeros, quando se encontram em água. Assim, os grupos das cabeças polares encontram-se orientados para a água circundante e as cadeias de ácidos gordos ficam voltadas umas para as outras, para o interior da bicamada (Figura 3) (1).

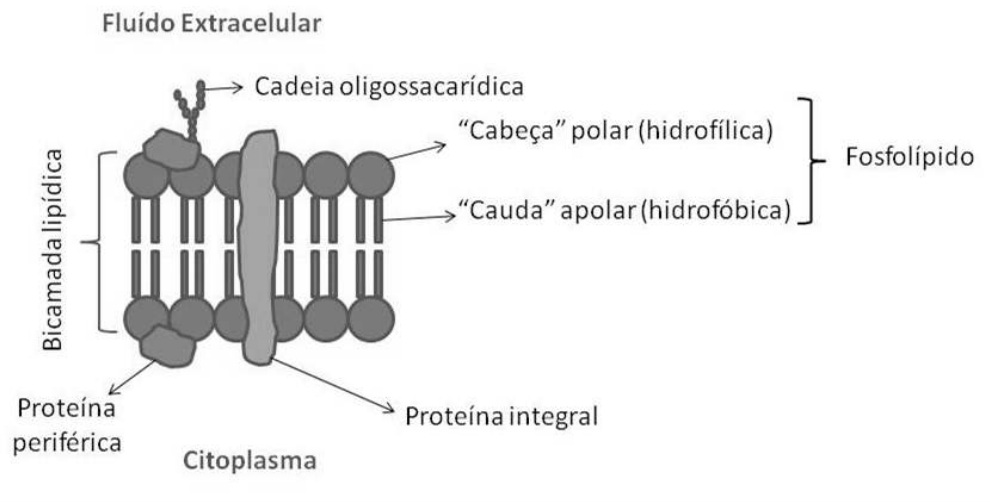


Figura 3 - Esquema representativo da membrana plasmática.

Uma única membrana pode ter mais de 100 lípidos distintos na sua composição. Os lípidos mais comuns pertencem, no entanto, a três classes: fosfolípidos, glicolípidos (conjugados de lípidos e açúcares) e os esteróis (e.g. colesterol). De um modo genérico, a membrana biológica contém cerca de 40-70% de fosfolípidos; 0-50% de colesterol, e 0-26% de glicolípidos (25).

Os fosfolípidos são os lípidos mais comuns na membrana biológica. A Figura 4 mostra uma molécula de fosfolípido. Esta molécula é constituída por quatro componentes: um ou dois **ácidos gordos, glicerol ou esfingosina**, um **grupo fosfato** e um **álcool** ligado ao grupo fosfato. O fosfato e o álcool formam a **cabeça polar**. As **caudas hidrofóbicas** são constituídas pelos ácidos gordos, que podem diferir no comprimento (contendo de 8 a 24 átomos de carbono, na maioria de 14 a 18) ou no número de insaturações (1-4) (26).

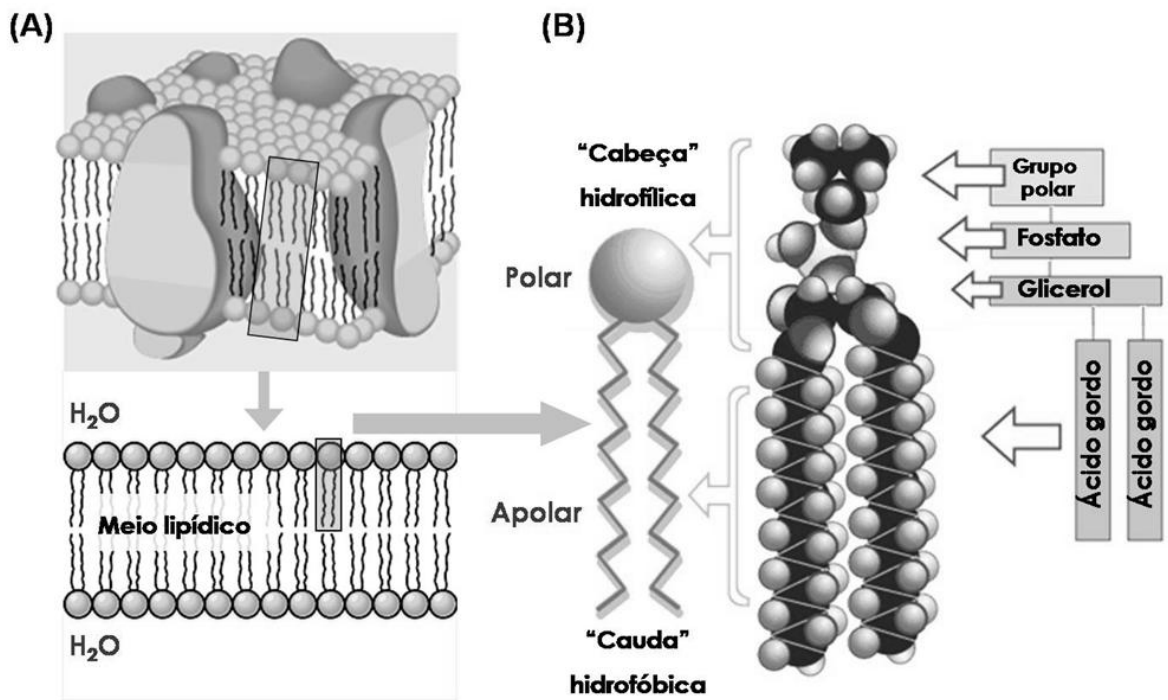


Figura 4 – (A) Ilustração da estrutura membranar constituída por uma bicamada de fosfolípidos e (B) Estrutura de uma molécula de fosfolípido. Adaptado de (27).

Os grupos polares dos fosfolípidos são usualmente **neutros** ou **carregados negativamente**. Assim, as cargas dos lípidos membranares estão usualmente no intervalo de +1 a -4. Uma carga positiva é rara, contudo, lípidos catiónicos são importantes, por exemplo, em vectorização de genes em que os lípidos formam complexos com os ácidos gordos, também chamados de lipoplexos. A maioria dos lípidos naturais é ainda **zwitteriónica** e caracterizada por fortes momentos dipolares (26, 28, 29).

1.3 Aspectos da biofísica membranar condicionados pelo polimorfismo lipídico

Como foi referido acima, os fosfolípidos apresentam um carácter anfifílico devido à sua constituição em cabeças polares hidrofílicas e em caudas hidrofóbicas. Esta característica determina a capacidade dos fosfolípidos baixarem a tensão superficial da superfície de contacto entre dois meios e são, por isso, conhecidos como **agentes tensioactivos** ou **surfactantes** (15, 16, 30-32).

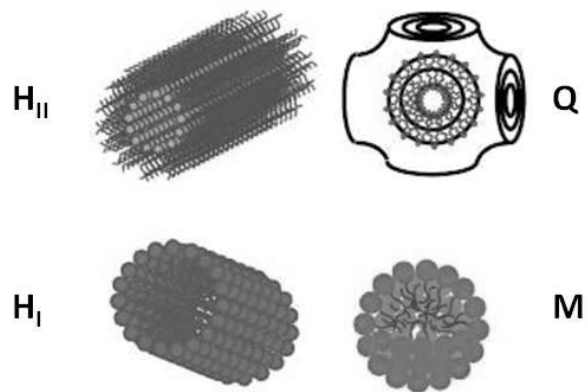
A afinidade antagónica para a água, apresentada pela mesma molécula de fosfolípido, leva a que estas moléculas, quando na presença de água, exibam a tendência de se

organizarem espontaneamente por um fenómeno designado de **auto-agregação lipídica** (15, 16, 30-32).

O mecanismo físico que conduz à agregação espontânea dos fosfolípidos em água é designado por **efeito hidrofóbico** (15, 16, 30-32).

Este fenómeno de auto-agregação é complexo. Começando por uma solução de fosfolípidos em água, o primeiro agregado a formar-se espontaneamente é a **bicamada** de fosfolípidos. A bicamada é uma **fase lamelar** e apenas uma das várias estruturas possíveis, nas quais os fosfolípidos se podem auto-organizar. A diversidade das formas de agregação mais comuns é mostrada na Figura 5.

FASES NÃO LAMELARES



FASES LAMELARES (L)

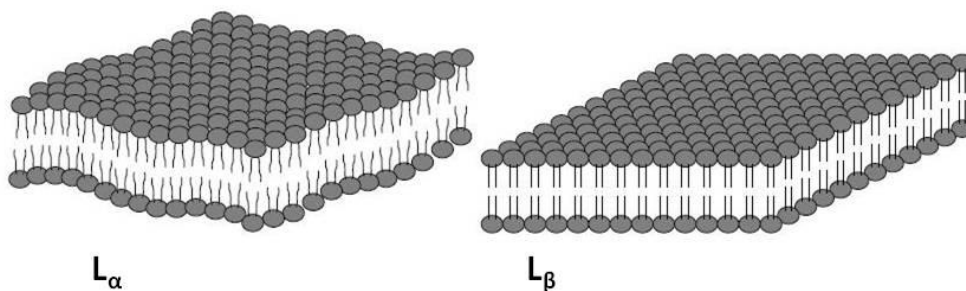


Figura 5 - Formas de agregação mais comuns dos fosfolípidos.

Os fosfolípidos apresentam, então, um polimorfismo muito rico que resulta de alterações subtis do balanço das interacções de atracção e repulsão entre as moléculas de fosfolípidos na interface lípido/água (20, 21). Este balanço é fortemente afectado por condições externas e pelos próprios fosfolípidos. As principais condições externas que determinam a agregação dos fosfolípidos são a **temperatura** e a **quantidade de**

solvente. Mas outros factores, tais como a **pressão**, **pH** e **concentração iónica** têm também influência significativa. As propriedades geométricas que afectam os tipos de agregados formados são o tamanho das cabeças lipídicas e o tamanho, número e grau de saturação das suas caudas apolares (33).

Na Figura 6 apresenta-se uma representação esquemática das transições de fase entre os diferentes agregados lipídicos, induzidas pela temperatura, hidratação e tipo de lípido.

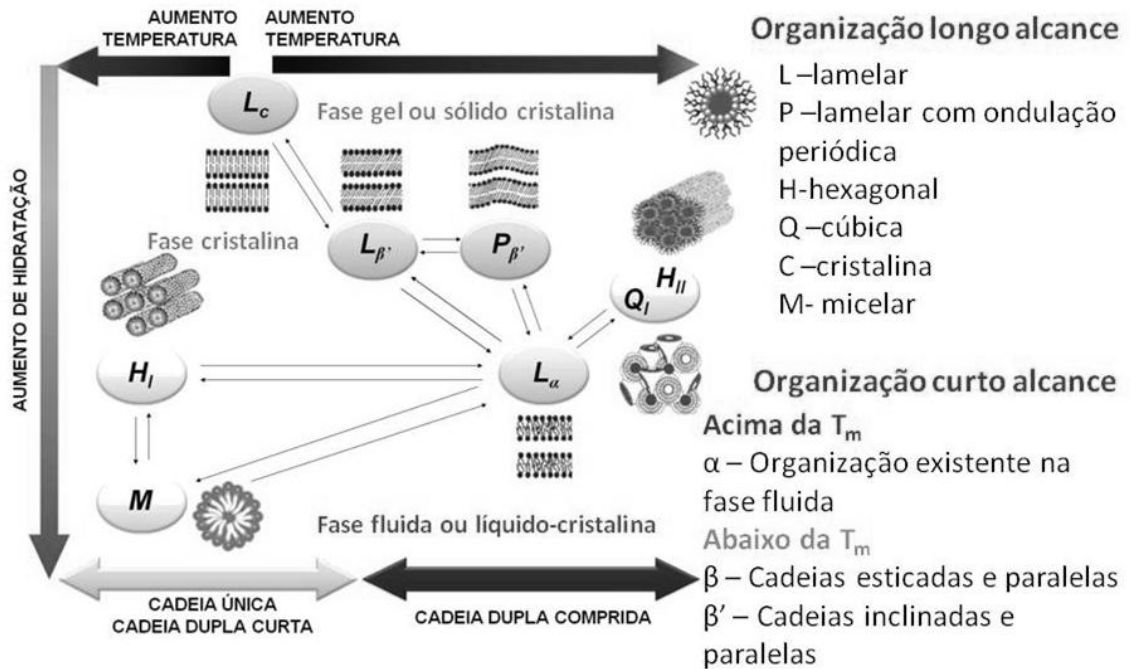


Figura 6 - Dependência das transições de fase dos agregados lípido-água com a hidratação, temperatura e o tamanho das cadeias de ácidos gordos dos fosfolípidos (adaptado de (33)). L_c corresponde à fase lamelar cristalina; $L_{\beta'}$ corresponde à fase lamelar gel; $P_{\beta'}$ corresponde à fase lamelar com ondulação periódica; L_{α} corresponde à fase lamelar fluida; H_I é a fase hexagonal e H_{II} é a fase hexagonal invertida; M é a fase micelar e Q é a fase cúbica.

Nas condições fisiológicas, a fase mais comum e mais relevante, sob o ponto de vista biológico, é a **fase lamelar líquido-cristalina** ou **fase fluida (L_{α})**. O movimento das cadeias de ácidos gordos dos fosfolípidos assegura a fluidez da bicamada lipídica. A rotação livre das ligações simples C-C resulta em movimentos vigorosos das caudas de fosfolípidos a temperaturas mais elevadas, o que também assegura a fluidez membranar. Com a diminuição da temperatura, a bicamada sofre uma transição de fase para uma fase mais ordenada, formando a **fase lamelar sólido-cristalina** ou **fase gel (L_{β})**. A

transição de fase da fase fluida para esta fase mais ordenada ocorre a uma temperatura designada por **temperatura de transição de fase principal (T_m)**. Se se diminuir ainda mais a temperatura chegar-se-á a uma fase ainda mais ordenada designada por **fase lamelar cristalina (L_c)**.

Para alguns lípidos (e.g. fosfatidilcolinas com ácidos gordos como mirístico e palmítico: DMPC e DPPC), para temperaturas abaixo da T_m há a formação de um estado intermediário chamado **fase lamelar com ondulação periódica ($P_{\beta'}$)** (Figura 7). Diminuindo mais a temperatura, este estado intermediário originará a fase gel ou sólido-cristalina, com moléculas de fosfolípidos inclinadas ($L_{\beta'}$).

Assim, é possível considerar, para as fosfatidilcolinas (ou lecitinas), três temperaturas de transição de fase, que determinam a existência de quatro estados físicos principais (31, 34):

- **Temperatura de subtransição (T_s)** – que corresponde à passagem da fase lamelar subgel ou cristalina (L_c) para a fase lamelar gel ou sólido-cristalina ($L_{\beta'}$ ou L_{β});
- **Temperatura de pré-transição (T_p)** – que corresponde à passagem da fase lamelar gel ou sólido-cristalina ($L_{\beta'}$ ou L_{β}) para a fase lamelar gel com ondulação periódica ($P_{\beta'}$);
- **Temperatura de transição principal (T_m)** - que corresponde à passagem da fase lamelar gel com ondulação periódica ($P_{\beta'}$) à fase lamelar fluida ou líquido-cristalina (L_{α}).

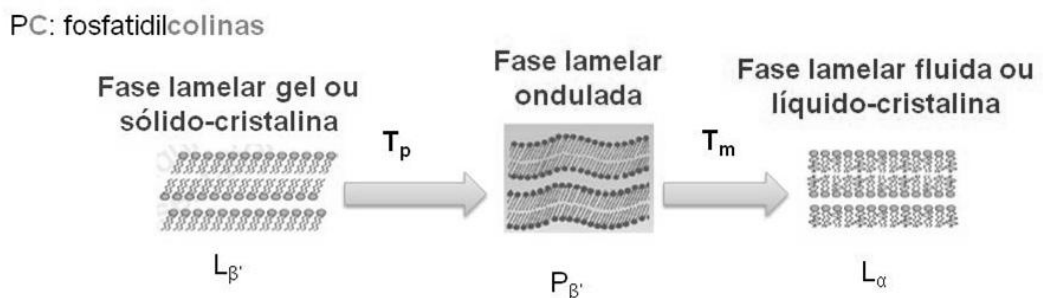


Figura 7 - Transições de fase existentes nas fosfatidilcolinas em que entre a fase gel e fluida existe um estado intermediário com ondulação periódica.

Apesar de ocorrerem estas transições de fase é, sem dúvida, a transição da fase sólido-cristalina ($L_{\beta'}$ ou L_{β}), passando pela fase lamelar ondulada (no caso particular das fosfatidilcolinas), para a fase líquido-cristalina (L_{α}), correspondente à **transição de fase**

principal, a mais relevante, já que esta transição de fase afecta a **ordem** e a **fluidez** da membrana (15, 16, 31, 32, 35-39).

Para além dos parâmetros físicos, a estrutura e organização espacial dos lípidos desempenham um papel fundamental na determinação do tipo de agregado que se forma. Os lípidos membranares podem diferir bastante na proporção de porções hidrofílicas e hidrofóbicas (e.g. um fosfolípido com cadeia dupla comprida dificilmente formará uma micela, pois existe um impedimento estérico a que tal aconteça; já um fosfolípido de cadeia simples ou cadeia dupla muito curta conseguirá formar micelas) e, assim, o número de ácidos gordos e o seu comprimento condicionam as propriedades hidrofóbicas, enquanto que a natureza do grupo da cabeça determina as propriedades hidrofílicas.

As fases lipídicas descritas podem ser alteradas, não só pelos factores mencionados (temperatura, hidratação, tipo de lípido), mas também pelas interacções lípido-lípido e lípido-péptido que ocorrem na membrana, e ainda pela perturbação gerada quando uma molécula externa (e.g. fármaco) interage com a membrana lipídica. Assim, a interacção fármaco-membrana pode ser estudada também ao nível de como as propriedades biofísicas membranares são alteradas em virtude desta interacção, o que pode ter consequências fisiológicas e relacionar-se com o próprio mecanismo de acção dos fármacos. Por exemplo, a incorporação de um fármaco no ambiente lipídico membranar pode alterar a microviscosidade membranar e, indirectamente, alterar o funcionamento de enzimas que, normalmente, para serem totalmente funcionais, possuem requisitos biofísicos da interface membranar muito específicos. Por outro lado, a inserção de um fármaco na membrana pode alterar a sua curvatura, sendo que a curvatura das membranas é um indicador do stress interno da bicamada lipídica e constitui, também, um factor importante para o funcionamento das proteínas (1).

2. Modelos membranares

O crescente interesse no conhecimento das interacções fármaco-membrana promoveu o desenvolvimento de modelos membranares que facilitassem a execução de novos estudos, de modo a limitar a heterogeneidade e complexidade das biomembranas (1).

A fragilidade e tamanho dos tecidos biológicos, bem como as interferências dos diversos componentes das biomembranas, são entraves à sua utilização em estudos ao nível molecular, sendo o desenvolvimento de modelos membranares crucial para o prosseguimento deste tipo de estudos (40).

A utilização de modelos membranares permite estabelecer e controlar as variáveis, de modo que os princípios físico-químicos e interacções específicas com as membranas sejam interpretados de forma mais precisa (1, 40). Com estes sistemas mais simples é possível obter informações que podem ser, posteriormente, integradas de modo a contribuir para um maior conhecimento dos sistemas mais complexos, ocorrendo, então, uma aproximação a sistemas biológicos reais (1). A utilização de membranas artificiais permite, então, o estudo da influência da estrutura de fármacos e da composição da membrana nas interacções fármaco-membrana (1).

Apesar das tentativas de biomimetização serem cada vez mais próximas da realidade (Tabela 1), há que ter consciência que os modelos membranares não são perfeitos, dado que nenhum deles é capaz, por si só, de mimetizar fielmente todos os aspectos da complexa estrutura das membranas. Contudo, o objectivo não passa apenas pela imitação, mas também pelo desenvolvimento de sistemas relativamente simples, com utilidade prática, que permitam mimetizar processos mediados pela membrana. Pretende-se, no fundo, simplificar e não reproduzir, para que seja possível entender melhor a Natureza (40).

Tabela 1 – Comparação das características físicas das bicamadas lipídicas artificiais e as membranas biológicas (1).

Propriedade	Bicamada lipídica artificial (modelo membranar)	Membrana biológica
Espessura (nm)	4,5-10	4-12
Tensão interfacial (J/m^2)	2,0-60	0,3-30
Índice de refração	1,56-1,66	$\approx 1,6$
Resistência eléctrica (Ω/m^2)	10^7 - 10^{13}	10^6 - 10^9
Capacitância (mF/m^2)	3-13	5-13
Voltagem de ruptura membranar (mV)	100-550	100
Diferença de potencial em repouso (mV)	0,140	10-88

Tendo em vista o que acima se referiu, é natural que a procura de modelos membranares tenha originado um vasto número destes modelos para estudos *in vitro*, capazes de simular muitas propriedades das membranas. É então importante que a selecção dos modelos membranares se revista de extrema cautela, sendo necessário conhecer os diferentes modelos, de modo a escolher o que melhor se adequa ao estudo pretendido (Tabela 2).

Tabela 2 – Comparação de modelos membranares. Adaptado de (40).

Modelos	Constituintes	Peso Molecular Médio	Diâmetro (Å)	Estabilidade	Efeito da Temperatura
Micelas aquosas	Tensioactivos	2000-6000	30-60	Semanas, meses	Sem transição de fase (T_m)
Micelas invertidas	Tensioactivos	2000-6000	40-80	Semanas, meses	Sem transição de fase (T_m)
Micro-emulsões	Tensioactivos, solventes polares e apolares	10^5 - 10^6	50-1000	Semanas, meses	Sem transição de fase (T_m)
Monocamadas	Tensioactivos	Variável	Variável	Horas, dias	Transição de fase (T_m)
Bicamadas planares (BLM)	Lípidos de origem biológica	Variável	Variável	Horas	Transição de fase (T_m)
Vesículas	Lípidos e tensioactivos		300-10000	Semanas	Transição de fase (T_m)
Sistemas “host-guest”	Poliéteres macrocíclicos e ciclodextrinas	500-5000	4-10 (tamanho cavidade)	Semanas, meses	Possíveis alterações conformacionais
Polímeros iónicos	Grupos ionizáveis ligados a polímeros	Variável	Variável	Semanas, meses	Possíveis alterações conformacionais

Apesar de os modelos membranares existentes serem numerosos, seguidamente faz-se referência, com maior detalhe, aos lipossomas (vesículas de fosfolípidos), por serem os modelos mais vulgarmente utilizados nos estudos de interacção fármaco-membrana, nomeadamente, no que respeita aos estudos das propriedades biofísicas das membranas. A escolha destes modelos deve-se, principalmente, ao ambiente químico e anisotrópico que apresentam (semelhante ao que se observa nas membranas biológicas), mas também à fácil preparação e boa caracterização das suas propriedades físicas, que apresentam semelhanças com as propriedades físicas das membranas

biológicas (Tabela 1). São, assim, modelos de manuseamento mais fácil e reprodutível que a utilização de células ou tecidos animais, e, por estas razões, são os modelos seleccionados para a realização dos trabalhos que constam nesta dissertação (41).

2.1 Lipossomas

Os lipossomas são vesículas esféricas que consistem numa ou mais bicamadas de membranas, que apresentam uma versatilidade única (em composição, tamanho e capacidade de incorporar e encapsular materiais) que lhes confere uma vasta aplicabilidade, quer em análise química e bioquímica, quer na indústria (42).

Um agente anfifílico constituído por um grupo hidrofílico ligado a duas cadeias hidrofóbicas longas não consegue, devido ao seu volume, organizar-se em micelas quando em solução aquosa se encontra acima da concentração micelar crítica (CMC). Em vez disso, este agente anfifílico apresenta a capacidade de formar agregados em bicamada lipídica (Figura 8). Estes agregados esféricos, designados por vesículas, são muito maiores que as micelas, já que a bicamada lipídica que se forma dobra-se sobre si própria, de modo a reduzir a exposição das faces laterais hidrofóbicas à água. Na sequência da sua formação há uma parte do solvente que é retida no interior das vesículas. Quando formadas por fosfolípidos, estas vesículas são denominadas lipossomas (26, 28, 43-45).

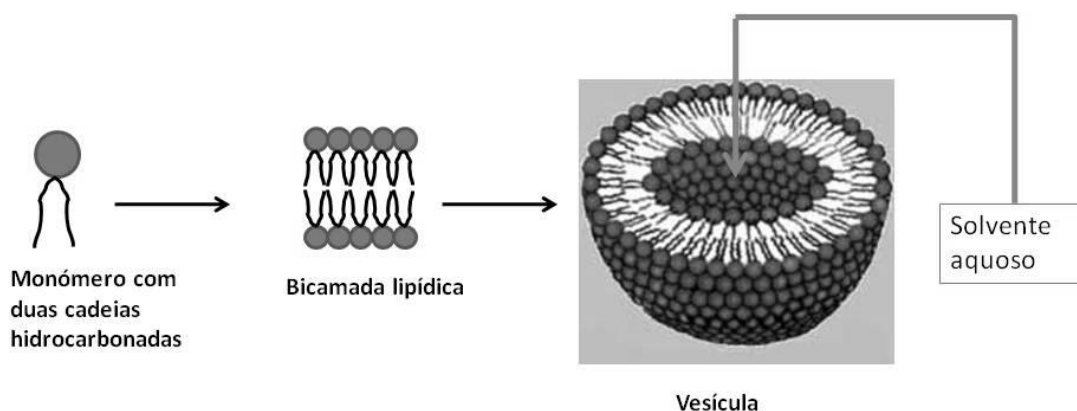


Figura 8 - Representação esquemática da organização dos fosfolípidos numa vesícula lipídica (lipossoma).

Quando se pretende utilizar os lipossomas como modelos que sejam representativos das biomembranas, há que ter em conta a semelhança com a membrana a mimetizar, e as propriedades de relevância para o estudo em questão devem estar bem caracterizadas. Daí que existam vários tipos de fosfolípidos naturais e sintéticos, por exemplo, fosfatidilcolina da gema de ovo (EPC), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) e dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC).

Os lipossomas são estruturas rígidas com elevados valores de viscosidade no interior das vesículas, mas que apresentam, no entanto, características dinâmicas, apresentando um gradiente de fluidez semelhante ao das membranas biológicas (39, 40). De acordo com este gradiente de fluidez, o grupo glicerol é a parte do fosfolípido com movimento mais restrito, os grupos metilénicos acídicos mais próximos do grupo polar apresentam uma rigidez elevada, e a liberdade dos movimentos vai aumentando à medida que se percorre a cadeia hidrocarbonada, com conseqüente diminuição da viscosidade do meio (40, 45). A constante dielétrica no interior da cadeia hidrocarbonada também diminui relativamente à verificada em solução aquosa, para valores muito semelhantes aos encontrados nas membranas biológicas (46).

Para além do que foi descrito acima, a enorme potencialidade dos lipossomas como “ferramenta analítica” pode ser explicada por diversos motivos, tais como: a existência simultânea de um meio lipofílico e de um meio aquoso, permitindo a imobilização de qualquer tipo de substância (independentemente da carga eléctrica, solubilidade ou peso molecular); a possibilidade de caracterização físico-química e controlo das suas propriedades (através de variações na composição e método de preparação); e ainda, a possibilidade de libertação controlada do seu conteúdo para os fluidos biológicos ou para as células (47).

Para além da carga, a natureza dos resíduos em cada molécula lipídica e o número de ligações duplas na cadeia são responsáveis pelas propriedades fundamentais da bicamada, como, por exemplo, a sua elasticidade e o tipo de fase lipídica (42). O tipo de fase lipídica é ainda condicionado pela temperatura utilizada nos estudos com os modelos membranares (26, 45):

- para temperaturas abaixo da T_m , as bicamadas lipídicas encontram-se ordenadas, dando origem ao estado sólido-cristalino ou gel em que as cadeias hidrocarbonadas dos fosfolípidos se apresentam com uma conformação distendida e empacotadas, ocupando um volume mínimo com uma liberdade de movimentos muito restrita;

- para temperaturas acima da T_m , as bicamadas encontram-se numa fase mais fluida que corresponde ao estado líquido-cristalino; nesta fase, existe uma maior mobilidade dos fosfolípidos, que ocupam um maior volume, levando a que o volume membranar aumente.

Assim, de acordo com a composição lipídica do modelo membranar escolhido e a temperatura a que são realizados os estudos, é possível estudar a influência de fármacos ao nível de diferentes estados de fluidez da membrana biológica. Este controlo da fluidez dos modelos membranares é importante, uma vez que a membrana biológica, embora esteja maioritariamente no estado fluido, apresenta algumas situações de menor fluidez. Por exemplo, a membrana após peroxidação lipídica apresenta um estado de menor fluidez que, portanto, é interessante para o estudo da actuação de fármacos antioxidantes (48). Além disso, ao nível da mucosa gástrica existem revestimentos lipídicos no estado gel de forma a proteger o estômago da erosão ácida. Neste caso, o estudo de fármacos que tenham uma acção lesiva sobre a barreira protectora gástrica faz mais sentido que seja realizado ao nível de modelos membranares que mimetizem a fase gel (49). Finalmente, a membrana celular não é integralmente fluida, apresentando domínios lipídicos (*lipid rafts*) no estado gel, sendo por isso de grande interesse estudar, igualmente, a acção de fármacos quer no estado fluido quer no estado gel da membrana (1).

2.1.1 Classificação morfológica dos lipossomas

Para proceder à classificação morfológica dos lipossomas recorre-se a critérios como o tamanho e número de bicamadas (lamelas) (42).

As vesículas multilamelares são constituídas por várias bicamadas lipídicas (5 ou mais), aproximadamente concêntricas. O seu tamanho é da ordem dos micrómetros (0,4 e 3,5 μm) e formam-se espontaneamente quando o filme lipídico é exposto a um excesso de tampão aquoso. As propriedades deste tipo de vesículas não são, no entanto, facilmente controladas, uma vez que a obtenção de MLVs a partir da hidratação do filme lipídico com um solvente aquoso origina vesículas muito heterogéneas, com uma grande variação no tamanho e lamelaridade. São muito utilizadas a nível industrial e no estudo de propriedades estruturais, dinâmicas e termodinâmicas das membranas a nível laboratorial (devido à sua maior concentração lipídica) (26, 41, 42, 45, 50).

As vesículas unilamelares são muito utilizadas em investigação, pois são de fácil preparação e as suas propriedades são bem caracterizadas. Podem ser vesículas unilamelares pequenas, grandes ou gigantes (42).

As LUVs, vesículas unilamelares grandes, são lipossomas formados por uma única bicamada lipídica e com tamanhos superiores a 100 nm. São modelos melhor definidos estruturalmente, sendo muito utilizados quando são necessários sistemas de interpretação mais simples como mimetizadores da membrana plasmática (26). As SUVs são mais pequenas em relação às LUVs, com diâmetros entre 25 e 50 nm (41). São modelos muito utilizados em estudos de superfície (51). Podem utilizar-se, também, vesículas unilamelares gigantes (GUV), modelos que apresentam tamanhos superiores a 1 μm (52).

As vesículas oligolamelares (LOV) e os lipossomas multivesiculares (MVL) são também utilizados, mas com menor expressão (Figura 9).

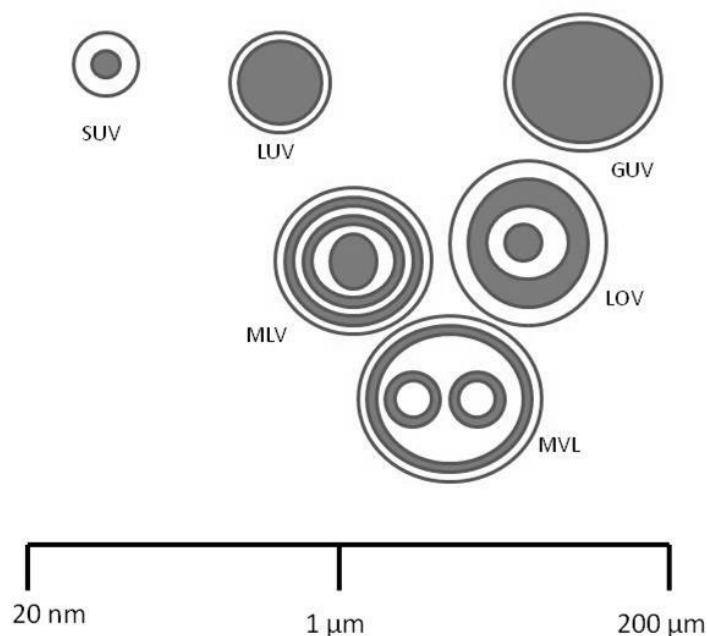


Figura 9 – Esquema representativo dos diferentes modelos membranares e sua classificação: MLV (*large multilamellar vesicles*); LUV (*large unilamellar vesicles*); SUV (*small unilamellar vesicles*); GUV (*giant unilamellar vesicles*); LOV (*large oligolamellar vesicles*); MVL (*multivesicular liposomes*). A cinza está representado o conteúdo aquoso nas vesículas. Adaptado de (42).

É também possível uma classificação dos lipossomas segundo a sua carga de superfície, sendo esta determinada pela carga da parte polar das moléculas anfifílicas. Os

lipossomas são então classificados em aniónicos, catiónicos, zwitteriónicos e não-iónicos (41). Esta classificação é, contudo, menos utilizada que a classificação morfológica.

2.1.2 Preparação dos lipossomas

Existem vários métodos para a preparação de lipossomas de diferentes tamanhos e lamelaridade (número de bicamadas). O método mais corrente baseia-se no método da hidratação do filme lipídico (26). De acordo com este método, o lípido ou mistura de lípidos são co-dissolvidos num solvente orgânico (normalmente misturas de clorofórmio e metanol) e a solução lipídica resultante é levada à secura recorrendo a um evaporador; à liofilização ou a secagem por spray. De seguida, a amostra é agitada por acção mecânica na presença de um meio de hidratação (tampão) e obtêm-se os MLVs (42).

A partir dos MLVs é possível obter vesículas unilamelares, recorrendo a diversos métodos mecânicos, tais como: a extrusão, sonicação, liofilização, hidratação/desidratação/intumescência, electroformação ou injeção de solvente (Figura 10) (42).



Figura 10 – Esquema das diferentes técnicas que permitem a obtenção de vesículas unilamelares. Adaptado de (42).

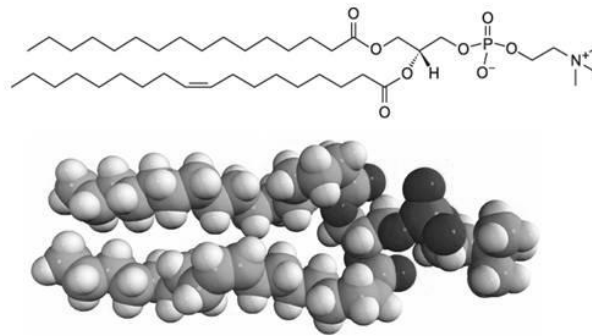
No caso do presente trabalho, os modelos membranares seleccionados para os estudos realizados foram as vesículas unilamelares grandes (100 nm) que, tal como foi referido, apresentam a vantagem de serem facilmente caracterizadas. A técnica seleccionada para a obtenção de LUVs é descrita com detalhe no Capítulo IV.

2.1.3 Lípidos mais utilizados

Como foi referido acima, os lipossomas são modelos muito versáteis, já que permitem uma grande variabilidade, muitas vezes conseguida devido à sua composição. Assim, os lípidos mais utilizados são a fosfatidilcolina (neutra) e o ácido fosfático, fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina (com carga negativa). A fosfatidilestearilamina é utilizada quando se pretendem lipossomas catiónicos (42).

A escolha dos lípidos a utilizar, em modelos membranares que mimetizem a membrana biológica, deve ser feita de acordo com os componentes lipídicos maioritários dessas membranas. Assim, tendo em conta que os fosfolípidos são os lípidos mais comuns da membrana biológica e que estes estão na sua maioria na forma zwitteriónica, no trabalho desenvolvido no âmbito desta dissertação foram escolhidos, como lípidos, os fosfolípidos da lecitina da gema de ovo e DPPC:

- Fosfatidilcolina da gema de ovo (EPC): são fosfolípidos naturais extraídos da gema de ovo, sendo os mais abundantes na natureza; são também designados por lecitinas; correspondem a uma mistura de vários fosfolípidos de diferentes tamanhos e insaturações das cadeias hidrocarbonadas; o ácido palmítico é o ácido gordo mais abundante e encontra-se geralmente na posição *sn-1*; o ácido oleico é o segundo ácido gordo mais abundante e geralmente situa-se na posição *sn-2*; são obtidos a baixo custo e a pH fisiológico encontram-se na forma neutra, apresentando-se quimicamente inertes; ao EPC não se pode atribuir um valor definido da T_m , dado que tem uma composição heterogénea (normalmente a T_m encontra-se dentro do intervalo de -15 °C a -7 °C e, portanto, lipossomas constituídos por este tipo de lípidos encontram-se no estado fluido à temperatura ambiente) (Figura 11) (41, 45).



<p>L-α-fosfatidilcolina Fórmula molecular: $C_{42}H_{82}NO_8P$ PM: 770.123 Armazenamento: $-20^{\circ}C$</p>

Figura 11 – Estrutura e características da fosfatidilcolina de gema de ovo (EPC). Adaptado de (53).

- Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC): são fosfolípidos semi-sintéticos muito utilizados em investigação, pois, ao invés de constituírem uma mistura heterogénea de lípidos, são compostos por determinadas cadeias lipídicas (DPPC), sendo então mais facilmente caracterizáveis; encontram-se electricamente neutros ao pH fisiológico; a T_m descrita é de $41,4^{\circ}C$ (Figura 12) (26).

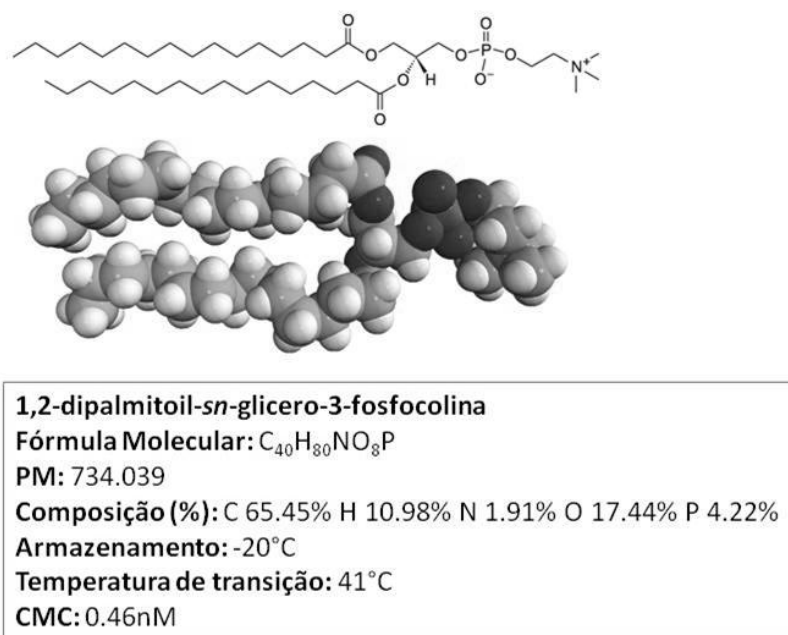


Figura 12 - Estrutura e características da dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC). Adaptado de (53).

2.1.4 Caracterização e estabilidade dos lipossomas

A caracterização dos lipossomas obtidos é feita a partir da determinação do tamanho médio das vesículas e da distribuição da sua carga de superfície, através de técnicas de dispersão de luz dinâmica. As técnicas que permitem a caracterização serão abordadas com maior detalhe no Capítulo III desta dissertação (42).

Para além da caracterização de uma suspensão de lipossomas acabada de obter, não se pode descurar que, com o tempo, são possíveis diversas alterações que podem comprometer a utilização desta suspensão lipossómica. É, portanto, necessário avaliar a estabilidade dos lipossomas com o tempo.

A estabilidade física das suspensões avalia-se pela estabilidade de tamanho dos lipossomas. As alterações físicas que podem afectar a qualidade dos lipossomas são a agregação, fusão, deposição, ruptura membrana e libertação do seu conteúdo (caso se pretenda encapsular um soluto no seu interior) (26, 42, 45).

Para a instabilidade química contribuem os processos de hidrólise e oxidação. A exposição à luz, ao oxigénio e a temperaturas elevadas promovem o processo de

oxidação, logo, é necessário o manuseamento e armazenamento de modo a evitar estes factores. A hidrólise vai degradar os fosfolípidos nos seus constituintes como, por exemplo, os ácidos gordos, ficando estes livres em solução e contribuindo, assim, para a instabilidade física. Sabe-se que a hidrólise ocorre em menor extensão quando as temperaturas são baixas e o pH se encontra próximo da neutralidade (26, 42, 45, 54-56).

Como se utilizam suspensões lipossómicas com água, a contaminação microbiológica é também possível, sendo que o seu armazenamento deve ser feito a baixas temperaturas.

Então, diversos estudos realizados com o objectivo de determinar as condições de armazenamento mostram que os lipossomas, quando num tampão com pH 7,4 e armazenados a temperaturas que rondem os 4°C não apresentam alterações da estrutura membrana durante 5 a 7 dias (55, 56). Ainda assim, nestes estudos foram realizados ensaios utilizando lipossomas preparados no próprio dia do ensaio ou, quando muito, no dia anterior, de forma a que os problemas de estabilidade das vesículas lipídicas não afectassem a qualidade dos resultados.

2.1.5 Utilização dos lipossomas

A utilização dos lipossomas encontra-se disseminada pelas várias áreas do saber, já que existem milhares de artigos científicos publicados com referências a estas estruturas como modelos membranares. Assim, é possível encontrar lipossomas aplicados na Química-Física de lípidos, na formação de domínios lipídicos em membranas, em interações celulares, na deformabilidade de sistemas lipídicos, em estudos de microscopia de fluorescência, nos estudos da interacção fármaco-membrana *in vitro*, nos estudos da permeabilidade da membrana e transporte de fármacos, etc. (1, 40, 57-62).

Nas Ciências Biomédicas, os lipossomas aplicam-se em sistemas transportadores, em testes de diagnóstico, transfusões sanguíneas na ausência de dador apropriado, desintoxicação através da utilização de agentes quelantes, entre outros. Também têm aplicações agrícolas (na estabilização de fertilizantes), pecuárias (maturação de lacticínios), industriais, e em processos de purificação, recuperação, catálise ou conversão de energia (1, 26, 63-66).

3. Fármacos cardiovasculares estudados

Os fármacos cardiovasculares estudados bloqueiam os receptores β e são utilizados numa variedade de condições clínicas, tais como a hipertensão, doença cardíaca isquémica, arritmias, desordens neurológicas e endócrinas, entre outras (67, 68).

Os β -bloqueadores são quimicamente semelhantes ao isoproterenol (Figura 13), que é um potente agonista dos receptores β (67).

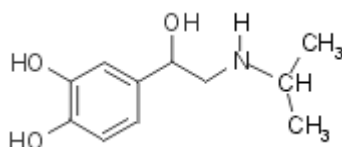


Figura 13 – Estrutura do isoproterenol. Adaptado de (69).

No geral, estes fármacos são bem absorvidos após administração oral, sendo rapidamente distribuídos e apresentando elevados volumes de distribuição (67).

O seu mecanismo de acção passa, fundamentalmente, por antagonizar o efeito das catecolaminas nos receptores β , ou seja, os β -bloqueadores ocupam os receptores β e reduzem competitivamente a ocupação desses receptores pelas catecolaminas e outros agonistas β (67, 70). A maioria dos efeitos destes fármacos deve-se ao bloqueio dos receptores β , contudo, algumas das suas acções podem estar relacionadas com a actividade agonista parcial nos receptores β e acção local anestésica (67).

É possível uma outra divisão deste grupo de fármacos quanto à sua afinidade relativa para os receptores β_1 e β_2 . As diferenças de afinidade para estes receptores podem trazer consequências relevantes na clínica (67). A Tabela 3 mostra a distribuição dos receptores β no organismo e a principal acção resultante da sua activação.

Tabela 3- Distribuição dos receptores β no organismo e principal acção resultante da sua activação. Adaptado de (67).

Tipo	Tecido	Acção
β_1	Coração	Aumento da força e taxa de contracção
β_2	Respiratório, uterino e músculo liso vascular	Relaxamento do músculo liso
	Músculo-esquelético	Promoção do <i>uptake</i> de potássio
	Fígado	Activação da glicogenólise

Algumas substâncias que constam deste grupo terapêutico apresentam selectividade para os receptores β_1 ; outras apresentam actividade simpaticomimética intrínseca; outras, ainda, prolongam o potencial da acção cardíaca. Para além disso, também estão descritos para estes fármacos marcados efeitos directos na membrana (67, 71).

A interacção específica com a membrana celular, que resulta no bloqueio dos receptores β , compreende a ligação destes fármacos directamente aos receptores β , enquanto que os efeitos não específicos na membrana envolvem, presumivelmente, interacções com outros locais, podendo muitas vezes dever-se às propriedades hidrofóbicas dos fármacos (70). As moléculas desta classe que apresentem características hidrofóbicas necessitam, inicialmente, de penetrar a bicamada de modo a permitir uma interacção com o grupo polar. Os β -bloqueadores menos hidrofóbicos, com *para*-substituintes, experimentam interacções razoavelmente fortes com os grupos polares da superfície dos lipossomas. A disrupção das cadeias acil das bicamadas possibilita alterações bioquímicas adicionais, que se manifestam numa variedade de acções inespecíficas. Por outro lado, para os β -bloqueadores que experimentam interacções específicas com os grupos polares, na superfície da membrana, sem partição substancial, ocorre uma acção farmacológica mais específica (70). Há evidências que mostram que vários anfífilos catiónicos, como os β -bloqueadores, interagem preferencialmente com lipossomas aniónicos (68). Sabe-se também que numa série de β -bloqueadores, a partição com os lipossomas a pH 7,4 pode ser de magnitude variável e pode ser dependente do estado de fluidez do lipossoma (estado gel ou cristalino) (70).

A posição dos substituintes nas moléculas de β -bloqueadores condiciona, não só a penetração membranar, mas também o tipo de acção terapêutica dos β -bloqueadores. Os β -bloqueadores com substituintes nas posições *orto* ou *meta* são não-

cardioselectivos, enquanto que os que possuem substituintes *para* no anel aromático apresentam actividade cardioselectiva (70).

No geral, estes fármacos apresentam actividade anti-hipertensora, aumentam a resistência na passagem do ar, diminuem a pressão intraocular, inibem a estimulação simpática da lipólise, a glicogenólise é parcialmente inibida e o uso crónico aumenta os valores das fracções VLDL e HDL. A sua acção anestésica local tem sido atribuída a uma acção estabilizadora do potencial membranar (67).

Assim, estes fármacos são **utilizados** em diversas patologias como: hipertensão, doença cardíaca isquémica, arritmias cardíacas, glaucoma, hipertiroidismo, prevenção de enxaquecas (devido à sua actividade simpática), angina de peito, tremores, etc. (67, 71).

As **reações adversas** mais frequentes, decorrentes da utilização deste tipo de fármacos, são: bradicardia sinusal, bloqueios auriculoventriculares, tonturas, possível agravamento da insuficiência cardíaca, náuseas, vômitos, alterações do trânsito intestinal, dores abdominais, depressão, insónia, alucinações, broncospasmo. Também estão descritas alterações metabólicas como hipertrigliceridemia, diminuição do colesterol HDL (excepto para os que têm actividade simpaticomimética intrínseca), hiperglicemia, aumento do cálcio ionizado e hipercaliemia. Efeitos secundários menos frequentemente descritos são a capacidade de causar impotência e de mascarar crises de hipoglicemia, astenia, alterações visuais, parestesias, agravamento do síndrome de Raynaud, das crises hipoglicémicas e da psoríase (71).

Quanto às interacções resultantes da utilização concomitante de fármacos β -bloqueadores com outros fármacos distinguem-se a interacção existente com o verapamilo e diltiazem. Os β -bloqueadores podem ainda potenciar os efeitos da insulina e antidiabéticos orais. Por outro lado, a utilização de AINES pode contrariar o efeito anti-hipertensor dos β -bloqueadores. A utilização destes fármacos em conjunto com antidepressores tricíclicos e fenotiazinas pode potenciar o seu efeito (71).

3.1 Propranolol

O propranolol é o protótipo dos fármacos β -bloqueadores, não apresentando cardioselectividade, actividade simpaticomimética intrínseca e nem efeito bloqueador α . Apesar de ser quase completamente absorvido após administração oral, sofre extensa metabolização hepática e por isso, a sua biodisponibilidade é baixa (só cerca de 25% chega à circulação sistémica), sendo dependente da dose. Cerca de 90% do propranolol

circulante encontra-se ligado a proteínas plasmáticas. O propranolol é um fármaco lipossolúvel, que é utilizado na forma de cloridrato de propranolol de forma a facilitar a sua solubilidade no meio aquoso (67, 72, 73)(71).

Os seus efeitos terapêuticos derivam do facto de bloquearem os receptores β_1 e β_2 e estão reconhecidos no **tratamento** das enxaquecas, profilaxia da ansiedade, tratamento da privação do álcool, tremores, ansiedade, hipertiroidismo e hipertensão. A sua actividade anti-hipertensiva está relacionada com a sua actividade ao nível cerebral, onde este fármaco, por ser lipofílico, chega com facilidade. O propranolol tem ainda actividade aterogénica (67, 74) e as propriedades anestésicas locais deste fármaco, dado que é lipossolúvel, parecem contribuir para os seus efeitos anti-arrítmicos (71, 74).

O propranolol apresenta concentrações terapêuticas no plasma que se encontram no intervalo entre 0,05 a 1 $\mu\text{g/mL}$. Estão, então, definidas **posologias** entre 40 e 320 mg/dia de propranolol (71-73).

Os **efeitos adversos** mais frequentes são a sedação, distúrbios do sono e depressão. Estes efeitos adversos estão relacionados com o facto de o propranolol ser lipofílico e, portanto, atravessar com facilidade a barreira hemato-encefálica. Por outro lado, dado que é um bloqueador não selectivo dos receptores β , pode desencadear episódios de asma, pois bloqueia também os receptores β_2 (67).

A Tabela 4 mostra as formulações farmacêuticas com propranolol existentes no mercado português:.

3.2 Acebutolol

O acebutolol é um β -agonista parcial. Por isso, apresenta actividade simpaticomimética intrínseca e é cardioselectivo, sendo utilizado na hipertensão e angina de peito. O facto de apresentar actividade simpaticomimética intrínseca faz com que produza menos bradicardia, e menos alterações lipídicas que outros β -bloqueadores. Por outro lado, devido ao facto de ser cardioselectivo faz com que a sua utilização seja menos susceptível de causar crises de broncospasmo. Para além disso, o acebutolol não tem efeito bloqueador α (67, 71).

Este é um fármaco bem absorvido após administração oral e apresenta biodisponibilidade de cerca de 40%. Sofre metabolização hepática extensa e apenas 26% do fármaco se

encontra ligado a proteínas plasmáticas. Como é um fármaco menos lipofílico que o propranolol, não atravessa a barreira hemato-encefálica (72, 73, 75).

No entanto, é ainda assim muito útil no **tratamento** da hipertensão arterial e arritmia ventricular (75).

O acebutolol apresenta um pico plasmático de 0,7 µg/mL após a administração oral de 400 mg de fármaco. Estão, então, definidas **posologias** entre 200 e 800 mg de acebutolol (71-73).

Os **efeitos adversos** normalmente associados à sua utilização são a hipotensão e bradicardia, insónia, fadiga e tonturas (71, 75).

Na Tabela 4 são apresentadas as formulações farmacêuticas com acebutolol existentes no mercado português.

Tabela 4 - Especialidades farmacêuticas que contêm propranolol e acebutolol disponíveis no mercado português. Adaptado de (71).

Fármaco	Nome do medicamento	Dosagem/Composição	Forma farmacêutica
Propranolol	Inderal-LA 80	80 mg	Cápsulas de libertação prolongada
	Inderal-LA	160 mg	Cápsulas de libertação prolongada
	Inderal	40 mg	Comprimidos revestidos
	Inderal	10 mg	Comprimidos revestidos
	Inderal	1 mg/mL	Solução injectável
Acebutolol	Prent	200 mg	Comprimidos

A Tabela 5 apresenta um resumo das características dos fármacos estudados neste trabalho:

Tabela 5 – Resumo das características farmacológicas do propranolol e acebutolol.
Adaptado de (67).

Característica	Acebutolol	Propranolol
Selectividade	β_1	Sem
Actividade agonista parcial	Sim	Não
Acção anestésica local	Sim	Sim
Lipossolubilidade	Baixa	Elevada
Semi-vida, eliminação (horas)	3-4	3,5-6
Biodisponibilidade aproximada	50	30 (dependente da dose)

4. Sondas de fluorescência usadas nos estudos biofísicos membranares

As sondas de fluorescência são fluoróforos extrínsecos inseridos no sistema membranares a estudar, e são frequentemente utilizados em estudos de alteração da ordem da membrana e da sua fluidez, já que apresentam dinâmicas rotacionais diferentes no estado excitado para diferentes ambientes lipídicos (1, 76). É possível avaliar a fluidez membranares através de estudos de anisotropia das sondas de fluorescência, uma vez que, alterações na rigidez da matriz lipídica que envolve a sonda levam a alterações no movimento rotacional desta e, como tal, provocam alterações na anisotropia (41, 77). Por outro lado, as sondas de fluorescência permitem a obtenção de informação variada a partir da análise dos seus espectros de excitação e emissão, do rendimento quântico de fluorescência e do tempo de vida no estado excitado (78, 79). Quimicamente, as sondas são fluoróforos geralmente hidrofóbicos ou anfífilicos, e a interpretação do seu comportamento depende, em larga escala, da sua localização na bicamada lipídica (77).

As vantagens associadas ao seu uso são:

- obtenção de informação sobre a polaridade e microviscosidade da matriz membranares em estudo (41, 78);
- monitorização de regiões específicas da membrana devido à existência de sondas diferentes com localizações bem definidas (41, 78);
- minimização das perturbações lipídicas que possam eventualmente ocorrer devido à sua inclusão na membrana, uma vez que podem ser utilizadas em baixas concentrações (41, 78).

As características que um composto deve possuir para ser utilizado como uma sonda de fluorescência são:

- um coeficiente de partição membrana-fase aquosa o maior possível para, desta forma, se encontrar incorporado na sua quase totalidade na bicamada lipídica; em alternativa, terá de possuir um rendimento de fluorescência na fase aquosa praticamente nulo (55, 76);
- um valor de rendimento de fluorescência na membrana elevado, de modo a que a razão sinal/ruído seja aceitável (55);

- valores de rendimento de fluorescência semelhantes para diferentes fases lipídicas (76);
- um valor no tempo de vida do estado excitado significativo para que seja possível a utilização de uma baixa concentração de sonda (55);
- uma elevada diferença na anisotropia de estado estacionário para diferentes fases lipídicas (76).

Quando satisfeitos, estes requisitos permitem a utilização da sonda em quantidades bastante inferiores às de lípido e de desactivador de fluorescência (fármaco), não interferindo, assim, com as características físico-químicas dos sistemas (55).

As sondas de fluorescência permitem avaliar qualitativamente as alterações globais da fluidez da membrana mas, a interpretação directa dos resultados experimentais deve revestir-se de cuidados, já que as alterações na fluidez devidas a agentes que perturbem as membranas não são uniformes em todos os segmentos das cadeias de ácidos gordos, e a sonda pode também influenciar os resultados (41).

Existem, então, algumas condicionantes no estudo da fluidez com sondas fluorescentes que colocam em causa a validade deste parâmetro, tais como: a localização do fluoróforo na bicamada lipídica, o impedimento dos movimentos rotacionais das sondas inseridas nas membranas e a alteração no tempo de vida do estado excitado do fluoróforo (41). Estas condicionantes serão a seguir descritas com mais detalhe.

Localização do fluoróforo na bicamada lipídica

A incerteza da localização da sonda na bicamada lipídica pode conduzir à incerteza quanto ao tipo de alteração de anisotropia ocorrido, e poderá levar à dúvida se se tratará apenas de uma alteração da posição da sonda ou de uma verdadeira alteração da estrutura da membrana (41, 78).

É então necessária a utilização de sondas que possuam um comportamento ao nível da emissão bem caracterizado, bem como um local de solubilização membranar bem definido (e.g. sondas da série n-AS; DPH; TMA-DPH e ANS) (41).

Impedimento dos movimentos rotacionais das sondas inseridas nas membranas

Quando uma molécula fluorescente num solvente isotrópico é excitada por luz polarizada, a anisotropia de fluorescência (r) decai exponencialmente com o tempo, aproximando-se de zero (78, 80). É, então, uma despolarização por decaimento exponencial, descrito pela equação de Perrin (Equação 1) (77, 78, 80):

$$r = \frac{r_0}{1 + (\tau/\theta)} \quad \text{Equação 1}$$

em que τ é o tempo de vida do fluoróforo no estado excitado, θ é o tempo de correlação rotacional e r_0 é a anisotropia fundamental.

No caso de a sonda se encontrar num ambiente anisotrópico de uma membrana, a sua rotação é impedida e a anisotropia de fluorescência decai, mas para um valor finito, diferente de zero r_∞ (41, 78, 80). Para descrever o decaimento em meios anisotrópicos é utilizada a equação de Perrin modificada (Equação 2) (78, 80):

$$r = \frac{(r_0 - r_\infty) \times \theta}{\theta + \tau} + r_\infty \quad \text{Equação 2}$$

θ e r_∞ representam diferentes limitações à rotação do fluoróforo. O valor de θ depende da resistência local à rotação (microviscosidade local) e r_∞ reflecte principalmente a limitação que o ambiente local da sonda impõe à extensão da sua rotação (78, 80).

Estes impedimentos ao movimento rotacional da sonda em meios anisotrópicos poderiam levar a preferir estudos de anisotropia resolvida no tempo (que permitem determinar r_∞), em alternativa à anisotropia em estado estacionário. Contudo, a utilização de um comprimento de onda de excitação bem definido (uma vez que o valor da anisotropia varia com a variação do comprimento de onda de excitação) e a execução das determinações a temperaturas às quais a membrana esteja na fase fluida, permite a rotação desimpedida das sondas (r_∞ muito próximo de zero) (41, 77, 78). Nestas condições, o tempo de correlação θ é obtido através da equação de Perrin para ambientes isotrópicos, partindo de valores de anisotropia de estado estacionário (r_{ss}) (78).

A partir da equação de Stokes-Einstein (Equação 3) e dos valores de θ é possível saber da microviscosidade da membrana ($\bar{\eta}$) (78):

$$\theta = \frac{\bar{\eta} \times V}{RT} \quad \text{Equação 3}$$

onde T é a temperatura em K, R é a constante dos gases perfeitos e V é o volume da unidade rotacional. Para cada sonda, V/RT permanece invariável, logo, alterações no valor da $\bar{\eta}$ irão reflectir-se em alterações do valor de θ que, por sua vez, se irão reflectir em alterações dos valores de r (78).

Desta forma, não há a necessidade da conversão dos valores de anisotropia em valores de microviscosidade, concluindo-se que, quanto mais elevada a anisotropia de uma sonda de fluorescência inserida no ambiente membranar, maior a microviscosidade da membrana. Por outro lado, assumindo que a fluidez membranar é inversamente proporcional à microviscosidade; a fluidez da membrana também pode ser entendida em termos de movimento anisotrópico das cadeias acil dos fosfolípidos (quanto maior a anisotropia, menor a fluidez membranar) (78).

Alteração no tempo de vida do estado excitado do fluoróforo

As variações da anisotropia, devido a concentrações crescentes de fármaco, podem resultar de uma verdadeira alteração da microviscosidade da membrana ou de uma alteração intrínseca do fluoróforo que corresponde a variações no tempo de vida do estado excitado da sonda τ (41, 77).

É, então, necessária a correção das medidas de anisotropia para descontar a influência das variações intrínsecas do τ (determinado através do estudo de desactivação de fluorescência colisional entre a sonda e o desactivador – substância em estudo) (41, 78).

A partir de τ_0 , tempo de vida característico de cada sonda (descrito na literatura) e de I_0/I , obtido por estudos de desactivação de fluorescência colisional (em que há uma diminuição dos tempos de vida e da intensidade de fluorescência), é possível calcular a alteração no tempo de vida do estado excitado do fluoróforo τ (78).

4.1 Sonda DPH

A anisotropia de fluorescência com 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) - uma sonda que se sabe estar localizada no núcleo hidrofóbico da bicamada - é uma técnica muito utilizada para avaliar o efeito de fármacos na fluidez e na ordem estrutural da membrana lipídica (1, 77, 81, 82).

Esta sonda apresenta uma cadeia carbonada insaturada com 2 anéis benzénicos ligados nas suas posições extremas (Figura 14) e, na literatura, o seu comprimento de onda de excitação é de 336 nm (41, 81, 83).

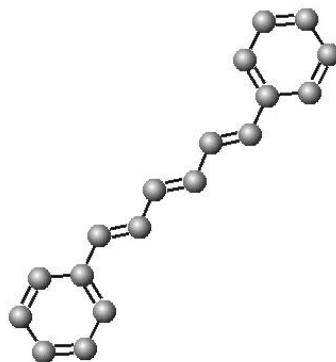


Figura 14 - Estrutura química da sonda 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno. A estrutura foi desenhada usando o software MarvinSketch 5.3.1 desenvolvido pela Chemaxon™.

A sonda DPH apresenta vantagens espectrais e propriedades estruturais que permitem a sua utilização para a determinação da ordem e da fluidez das bicamadas lipídicas dos lipossomas, membranas biológicas e células, bem como para detectar alterações na fluidez que possam acompanhar a transição de fase principal (da fase gel para a fase fluida ou líquido-cristalina) (76, 77, 82):

- apresenta um elevado coeficiente de extinção e elevado rendimento quântico de fluorescência em solventes não aquosos, o que possibilita a utilização de pequenas quantidades de sonda - daí minimizando as perturbações nas membranas - permitindo a obtenção de informação estrutural e dinâmica sobre as membranas (77);

- a molécula de DPH é uma molécula muito hidrofóbica logo, apresenta elevada afinidade para localizações profundas nas membranas (7,8 Å a partir do centro da bicamada) (84). Além disso, a DPH é uma molécula longa com uma cadeia hidrocarbonada de 14 Å de comprimento, e tem a forma de bastonete rígido que permite o seu empacotamento entre as cadeias de ácidos gordos dos fosfolípidos (Figura 15) (77, 81, 82, 85-87);

- apresenta as vantagens referidas acima - elevada diferença na anisotropia de estado estacionário para diferentes fases lipídicas (a anisotropia de fluorescência diminui com o aumento da temperatura na transição de fase gel/fluido); coeficiente de partição próximo da unidade e valores de rendimento de fluorescência semelhantes para diferentes fases lipídicas (76).

A DPH é ainda uma sonda que partilha igualmente entre os diferentes domínios laterais lipídicos na membrana, sem diferenças de concentração entre domínios lipídicos ordenados e desordenados, e está uniformemente distribuída entre todas as regiões lipídicas de uma célula viva (77).

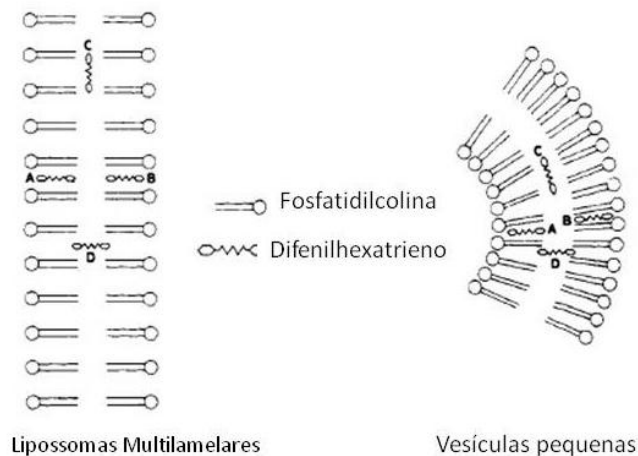


Figura 15 – Representação esquemática da localização da sonda de fluorescência no interior hidrofóbico de bicamadas de lipossomas multilamelares e de vesículas pequenas. Adaptado de (82).

Relativamente ao seu movimento, a sonda DPH pode mover-se livremente na região transversa das cadeias acil até ao centro hidrofóbico da bicamada (86). A rotação à volta do eixo longitudinal não despolariza a luz emitida, e só o movimento oscilante à volta do eixo que fica no plano da membrana pode ser observado.

4.2 Sonda TMA-DPH

O efeito de uma substância na ordem estrutural da membrana lipídica pode ser estudado pela determinação da anisotropia de fluorescência em estado estacionário da sonda TMA-DPH, (1-(4-trimetilamoniofenil)-6-fenil-1,3,5-hexatrieno) incorporada nos lipossomas, em função da temperatura (81, 88).

Na sua estrutura, esta sonda apresenta um grupo catiónico ligado ao anel fenilo da DPH (Figura 16), e o seu comprimento de onda de excitação, referido na literatura, é de 355 nm (81, 84).

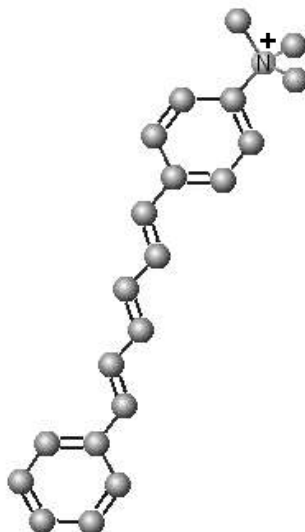


Figura 16 - Estrutura química da sonda 1-(4-trimetilamoniofenil)-6-fenil-1,3,5-hexatrieno. A estrutura foi desenhada usando o software MarvinSketch 5.3.1 desenvolvido pela Chemaxon™.

Devido à presença de um grupo catiónico na sua estrutura, a sonda TMA-DPH está ancorada na interface aquosa da membrana a 10,9 Å a partir do centro da bicamada e encontra-se fixa na região externa das cadeias acil (81, 84, 86). De acordo com esta localização membranar, a TMA-DPH permite monitorizar alterações na ordem lipídica na região mais próxima da interface água/membrana, a uma distância correspondente entre C10-C14 a partir da interface água/membrana (84, 88).

A escolha desta sonda anfipática tem dois propósitos (88, 89):

- a presença do grupo TMA ancorado na região da interface permite observar a interacção do fármaco com esta localização mais superficial da membrana ;
- o alinhamento paralelo da sua parte estrutural semelhante à DPH, com as cadeias hidrofóbicas dos fosfolípidos, permite a possível observação de alterações da fluidez da cadeia lipídica.

Uma das vantagens da utilização deste fluoróforo prende-se com o facto de evitar uma distribuição heterogénea da sonda na bicamada e minimizar, devido à repulsão electrostática do grupo cabeça da sonda, uma segregação que poderia surgir da baixa miscibilidade de uma sonda hidrocarbonada numa fase carbonada (88).

4.3 Sonda ANS

A sonda ANS (ácido 8-anilino-1-naftalenosulfónico) (Figura 17) liga-se fortemente a grupos catiónicos de proteínas e poliaminoácidos, e é extensivamente utilizada na caracterização dos locais de ligação de proteínas. Esta sonda é muitas vezes considerada como uma sonda não fluorescente quando ligada a locais de ligação a proteínas expostos (90).

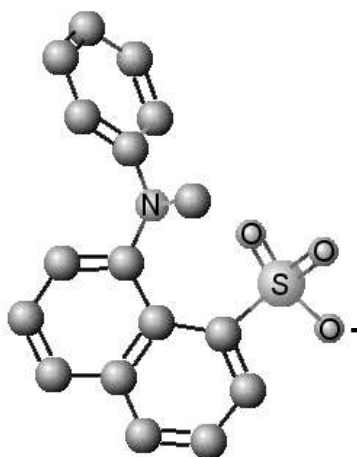


Figura 17 – Estrutura química da sonda ácido 8-anilino-1-naftalenosulfónico (ANS). A estrutura foi desenhada usando o software MarvinSketch 5.3.1 desenvolvido pela Chemaxon™.

É uma sonda não-covalentemente incorporada nos lipossomas (91).

O seu rendimento quântico e energia de emissão são afectados pela polaridade do solvente e viscosidade, e é muito utilizada no estudo de alterações estruturais induzidas por uma grande variedade de compostos em membranas naturais ou artificiais (90, 91).

É uma sonda de eleição, já que a sua interferência com as propriedades da membrana é negligenciável e tem características de absorção convenientes para a sua utilização nos estudos de interacção de fármacos com lipossomas (91).

Resumo

Enquanto que a sonda ANS se encontra localizada à superfície membranar, na interface aquosa, as sondas DPH e TMA-DPH estão localizadas na bicamada lipídica (86).

A sonda DPH encontra-se mais profundamente localizada no interior da bicamada lipídica, enquanto que a sonda TMA-DPH está posicionada mais próxima das cabeças polares da membrana (Figura 18) (92) .

A anisotropia de fluorescência com as sondas DPH e TMA-DPH relaciona-se com a mobilidade no ambiente envolvente da sonda, ou seja, reflecte a ordem das cadeias acil. Estudos com membranas marcadas com estas sondas permitem, por exemplo, determinar a influência de fármacos na microviscosidade e ordem membranar.

A fluorescência da sonda ANS ocorre apenas por ligação desta à superfície membranar, permitindo estudar, quando na presença de fármacos, se esta ligação é afectada, sinal de que o fármaco em questão se ligaria igualmente à superfície membranar, impedindo a ligação da sonda.

Assim, utilizando uma série de sondas bem caracterizadas e com localizações diferentes ao nível da membrana, é possível reunir uma série de informações distintas sobre a influência de fármacos ou outros compostos na biofísica membranar. Foi com base neste pressuposto que estas sondas foram escolhidas no âmbito do presente trabalho, para avaliar a acção dos fármacos cardiovasculares ao nível das propriedades biofísicas da membrana como será descrito nos capítulos seguintes.

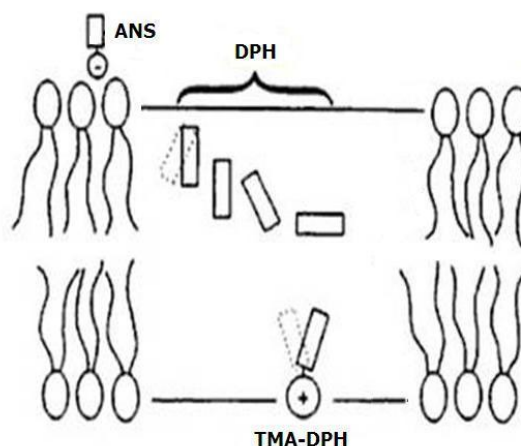


Figura 18- Diagrama esquemático das localizações propostas para as sondas DPH, TMA-DPH e ANS. As linhas quebradas representam tipos de movimentos possíveis.

III. Técnicas biofísicas para análise da interação dos fármacos cardiovasculares com as membranas

1. Determinação do coeficiente de partição por espectrofluorimetria e espectrofotometria derivativa

1.1 Definição e necessidade de determinação deste parâmetro

Um fármaco encontra muitas barreiras desde que entra no organismo até ao seu local de actuação (Figura 19). As barreiras encontradas podem ser físicas (membranas), físico-químicas (solubilidade, pH) ou bioquímicas (metabolismo). Cada barreira atenua a quantidade de fármaco que chegará ao local activo (93).

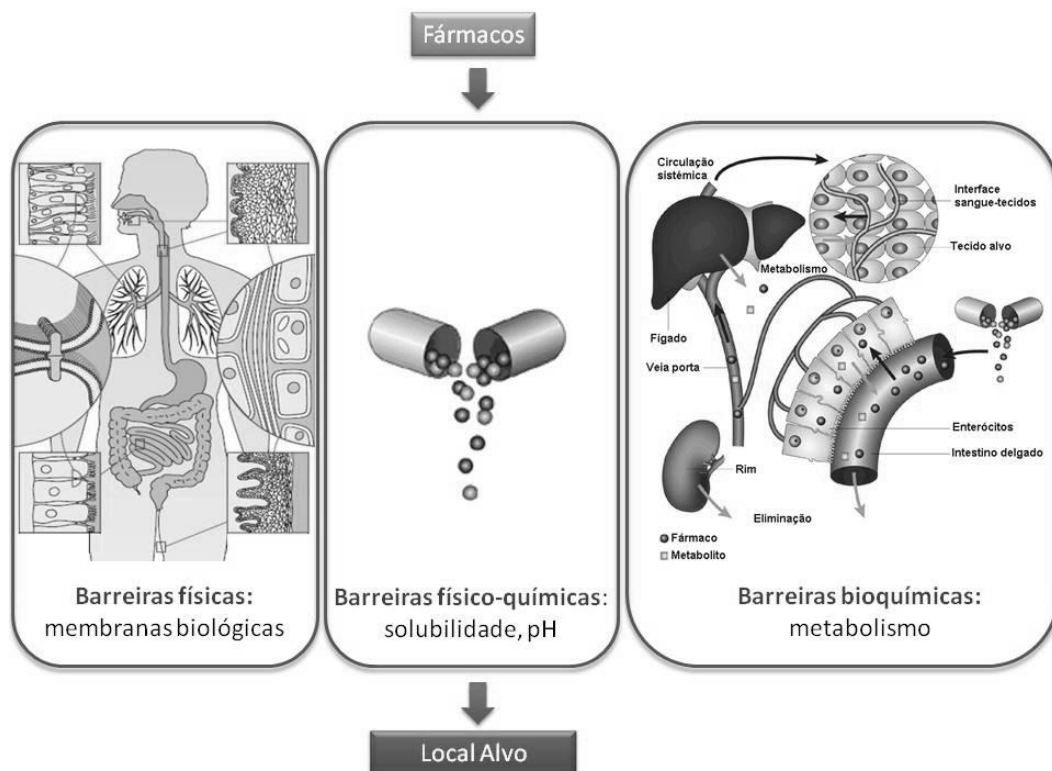


Figura 19 – Esquema descritivo das barreiras que condicionam a chegada dos fármacos ao local alvo da sua acção terapêutica. Adaptado de (94, 95).

A passagem dos fármacos através das membranas celulares é, então, determinante para que o fármaco atinja os locais alvo em concentração suficiente para permitir uma actividade biológica e, logo, uma resposta terapêutica (96). A passagem através das membranas pode dar-se por **transporte activo** (através de transportadores específicos), por **difusão facilitada** (através de canais iónicos) ou de forma passiva envolvendo uma **difusão simples** a favor do gradiente de concentração (Figura 20).

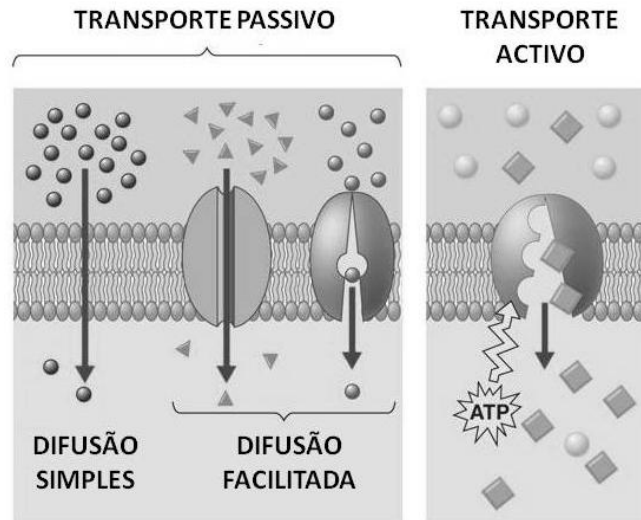


Figura 20 – Representação esquemática do transporte de fármacos através da membrana.

Embora alguns fármacos sejam transportados activamente por transportadores como a p-glicoproteína (P-gp), a maior parte dos fármacos atravessa as membranas por um mecanismo de permeação passiva. O transporte passivo dos fármacos através das membranas, para acederem aos locais de actuação, implica a existência de um equilíbrio adequado entre lipossolubilidade (solubilidade nas membranas) e hidrossolubilidade (solubilidade em ambientes aquosos, como o sangue e o citosol). Este equilíbrio determina a **lipofilia** do fármaco. É necessário um determinado grau de lipofilia para que a penetração nas membranas biológicas seja possível. No entanto, valores muito elevados de lipofilia, apesar de vantajosos no que se refere à elevada permeabilidade membranar e à distribuição nos tecidos, implicam também maior bioacumulação e possibilidade de toxicidade elevada. De facto, fármacos altamente lipofílicos têm uma solubilidade menor em água e, como tal, uma fraca eliminação renal, tendo ainda tendência a estabelecerem ligação às proteínas plasmáticas e a acumularem-se nas

reservas lipídicas, com conseqüente toxicidade decorrente da longa permanência no organismo. A lipofilia é, então, uma característica físico-química fulcral para o estudo da farmacocinética e farmacodinâmica dos fármacos, pois tem sido associada a diversos processos ao nível do organismo, tais como: transporte através de membranas, efeitos terapêuticos, efeitos tóxicos, fenómenos de bioacumulação em tecidos e acumulação ambiental (41, 97-99). Assim, para além da lipofilia ser importante para perceber o comportamento de um fármaco *in vivo* é, também, um óptimo indicador para a análise *in vitro* dos fármacos recém-sintetizados, permitindo fazer uma pré-selecção daqueles que serão mais promissores.

A forma mais comum de avaliar a lipofilia *in vitro* é através do **coeficiente de partição**, que se define pela razão da concentração de uma substância na fase orgânica pela concentração da mesma substância na fase aquosa¹ (Equação 4) (1, 100):

$$K_p = \frac{[A]_{\text{orgânica}}}{[A]_{\text{aquosa}}} \quad \text{Equação 4}$$

Para valores de K_p elevados (> 100), a probabilidade do fármaco interagir com o receptor por uma via transmembranar, ou de penetrar a membrana a uma profundidade adequada que permita a sua difusão até ao local activo, é maior (41). Assim, pelas razões atrás apontadas, o coeficiente de partição é um parâmetro indispensável tanto nos estudos prévios de fármacos recém-sintetizados, como na compreensão do mecanismo de acção dos fármacos, uma vez que permite avaliar a sua lipofilia e daí concluir acerca da sua solubilidade e permeabilidade (Figura 21).



Figura 21 – Possíveis localizações do fármaco num modelo membranar lipídico de acordo com as suas características de solubilidade e permeabilidade. Adaptado de (101).

¹ O coeficiente de partição é definido pela IUPAC em termos de actividades e a correspondência para concentrações é denominada razão de partição, mas dada a prática comum em literatura biológica do coeficiente de partição, neste trabalho adoptou-se esta nomenclatura.

1.2 Sistemas octanol/água e lípido/água

1.2.1 Coeficiente de partição de fármacos no sistema octanol/água ($K_{p\ O/A}$)

O coeficiente de partição no sistema octanol/água é o parâmetro mais vulgarmente utilizado na determinação da lipofilia de um composto (41, 97, 102). A razão para este sistema, ainda hoje, ser o mais amplamente utilizado está associada ao facto de ter sido o primeiro sistema a ser escolhido para a determinação da partição de compostos e, também, por ser uma técnica que revela alguma facilidade de execução, já que consiste na razão entre a concentração de um composto na fase orgânica (n-octanol) e na fase aquosa (41). Desta forma, uma determinação da partição de um composto no sistema octanol/água ($K_{p\ O/A}$) implica apenas realizar uma experiência, em que se adiciona uma quantidade conhecida de composto a um sistema bifásico constituído por um solvente orgânico (n-octanol), que mimetiza a fase lipofílica, e água e, após a separação das fases orgânica e aquosa, determina-se a quantidade de substância presente em cada uma das fases. Contudo, ao utilizar o sistema octanol/água é possível ocorrer uma simplificação exagerada, tendo em conta que os resultados nele obtidos são extrapolados para um sistema do tipo fase membrana/aquosa, e correlacionados com a sua actividade biológica (1, 102).

De facto, as membranas biológicas não podem ser mimetizadas correctamente pelo octanol, pois não são exclusivamente lipofílicas. As membranas biológicas são constituídas por uma bicamada de fosfolípidos e, portanto, apresentam características anfipáticas, sendo constituídas por uma zona interna de características apolares e duas zonas externas voltadas para o exterior e interior celular de natureza polar, o que permite concluir que o modelo do cálculo do $K_{p\ O/A}$ não traduz as interacções mais complexas entre as membranas e o fármaco, sendo então limitada a sua aplicação (41, 97).

A fraca correlação com a partição dos compostos nos sistemas membrana/aquoso, bem como o facto de o n-octanol ser relativamente tóxico e poluidor (aspectos opostos à ideia de química verde), fazem com que a utilização do sistema octanol/água tenha sido preterida para efectuar o cálculo do K_p (41).

1.2.2 Coeficiente de partição de fármacos no sistema lípido/água ($K_{pL/A}$)

Os sistemas octanol/água têm sido substituídos eficazmente pelos lipossomas e micelas devido às semelhanças que apresentam com as membranas naturais e, também, por permitirem o estudo das influências electrostáticas aquando dos fenómenos de partição, tendo em conta que forças hidrofóbicas, electrónicas e estéricas contribuem para a interacção total das membranas com a molécula de fármaco (Figura 22) (41, 97, 98, 102).

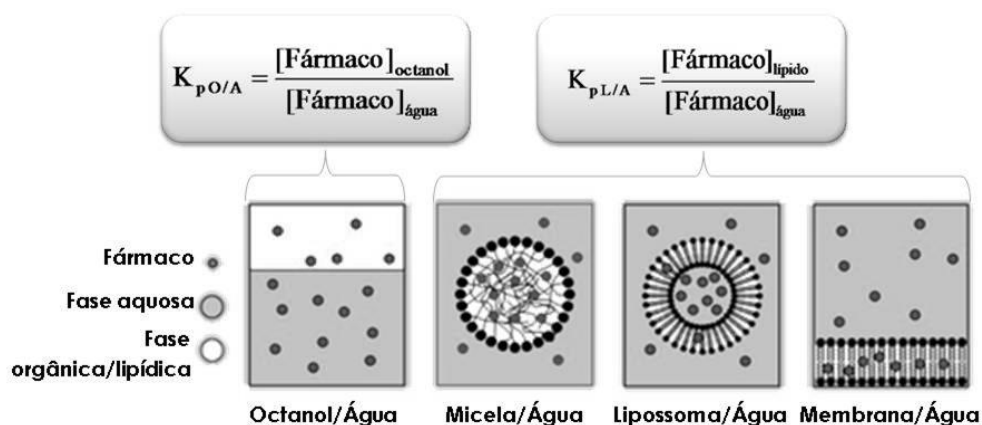


Figura 22 – Representação esquemática da determinação dos coeficientes de partição de um fármaco em sistemas bifásicos.

Comparando os valores de K_p de **espécies neutras**, obtidos em sistemas octanol/água e lípido/água, é possível verificar que os valores não diferem muito, já que nas espécies neutras prevalecem as ligações hidrofóbicas que são eficientemente contabilizadas nos dois sistemas. O mesmo não acontece com os coeficientes de partição dos **compostos anfipáticos** ou dos compostos **electricamente carregados** ao pH dos estudos, em que os valores de K_p são diferentes consoante os sistemas onde tenham sido determinados. Tal acontece porque o comportamento da partição destes compostos é determinado pela sua lipofilia, equilíbrio ácido-base, potencial para promover ligações de hidrogénio e sensibilidade conformacional em relação à polaridade do meio (bicamada)(1). Ou seja, o sistema octanol/água não contempla a possibilidade de se estabelecerem outro tipo de ligações para além das ligações hidrofóbicas, ao contrário do que acontece nos sistemas lípido/água, em que as ligações do tipo electrostático também são contabilizadas (Figura 23).

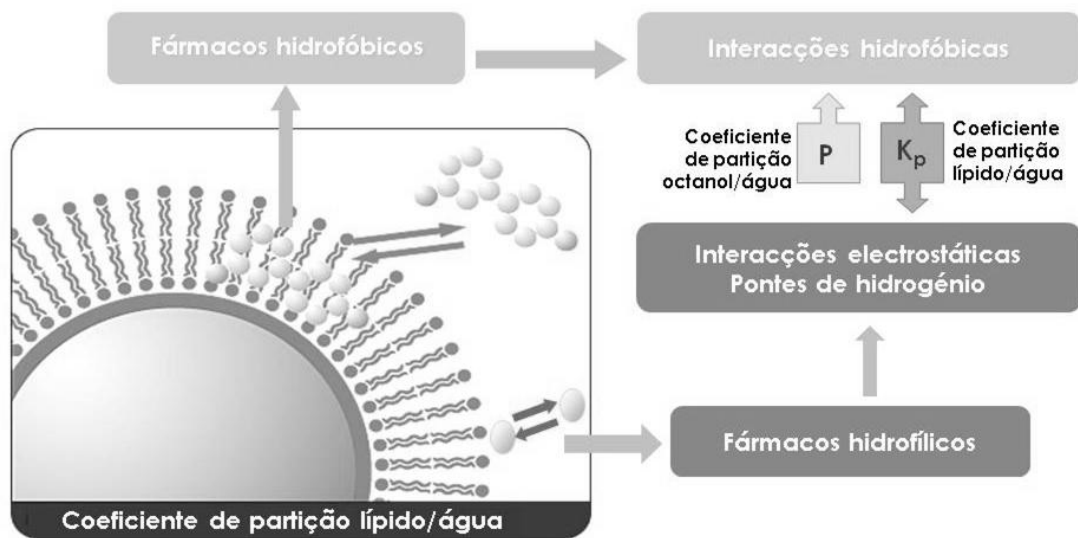


Figura 23 – Representação esquemática das diferenças entre a determinação do coeficiente de partição octanol/água e lípido/água em função da lipofilia dos fármacos em estudo.

Para além das vantagens que decorrem da melhor correlação entre os sistemas lipídicos e o comportamento observado nas membranas, os agregados lipídicos (micelas e lipossomas) são também fáceis de preparar e manusear, e não apresentam os problemas de toxicidade decorrentes do uso de solventes orgânicos (97).

1.3 Métodos utilizados na determinação do coeficiente de partição

Existem várias metodologias descritas na literatura para a determinação experimental do K_p em sistemas bifásicos lípido/água. Estas metodologias encontram-se distribuídas em dois grandes grupos: métodos que recorrem à separação de fases e métodos que não recorrem à separação de fases.

1.3.1 Métodos que recorrem à separação de fases

Estas metodologias consistem na separação inicial da fase lipídica e da fase aquosa, após a qual se procede ao doseamento directo e em separado das moléculas de soluto distribuídas em cada uma das fases (102).

Caso não exista um sinal físico (geralmente espectroscópico) que seja directamente relacionado com uma das espécies do composto a dosear (espécie livre em solução aquosa ou ligada à fase lipídica), estes são os métodos de eleição (102).

As desvantagens frequentemente observadas com estas metodologias prendem-se com a incompleta separação de fases e com a perturbação das condições de equilíbrio estabelecido entre as moléculas do composto ligado à fase lipídica e livre na fase aquosa (97, 102).

Face às desvantagens enumeradas optou-se no trabalho desenvolvido por recorrer a métodos que não exigem a separação de fases.

1.3.2 Métodos que não recorrem à separação de fases

Nos métodos que não recorrem à separação de fases, as medidas são efectuadas sem alteração das condições de equilíbrio, sendo a determinação do coeficiente de partição efectuada directamente nas soluções, nas quais o fármaco no agregado lipídico se encontra em equilíbrio com o fármaco livre em solução (100, 102). A determinação do K_p é efectuada por avaliação da alteração das propriedades de um dos componentes do sistema (41):

- Propriedades do fármaco após interacção com o agregado lipídico mimético da membrana (propriedades espectroscópicas, características ácido-base);
- Propriedades do agregado lipídico por acção do fármaco (permeabilidade, fluidez, tensão superficial, temperatura de transição de fase, carga superficial, entre outras);
- Propriedades de uma terceira molécula incorporada no sistema, funcionando como uma sonda e cuja variação das propriedades em função da interacção molecular é usada para avaliar a extensão da interacção.

1.3.2.1 Técnicas de espectroscopia óptica

1.3.2.1.1 Espectrofotometria derivativa

Uma vez que as características espectrais de um fármaco estão intrinsecamente relacionadas com as interações moleculares do seu ambiente circundante, na espectrofotometria de absorção no UV-Vis em meios heterogêneos, tais como micelas e lipossomas, as alterações das características espectrais desse fármaco (absortividade molar, ϵ e/ou comprimento de onda de absorção máximo, $\lambda_{\text{máx}}$) podem indicar que a molécula se localiza em meios com características de polaridade distintas (41, 98, 102, 103). Estas alterações podem, assim, ser utilizadas para a determinação do coeficiente de partição do fármaco entre a fase aquosa e lipídica. A quantificação do K_p a um valor fixo do comprimento de onda é possível, caso existam desvios batocrômicos ou hipsocrômicos na ordem dos 5 a 10 nm entre os espectros do fármaco distribuído pela fase aquosa e lipídica e/ou caso ocorra uma variação no valor de ϵ (maior ou igual a 10%) entre os dois solventes (104). Os desvios batocrômicos correspondem a desvios do $\lambda_{\text{máx}}$ para valores superiores a este e indicam a presença do fármaco num microambiente mais apolar; já os desvios hipsocrômicos são desvios do $\lambda_{\text{máx}}$ para valores inferiores e indicam que o fármaco se encontra num microambiente mais polar (104).

O recurso à espectrofotometria UV-Vis, para a determinação do K_p de um fármaco, apresenta bastantes vantagens pois, além da maioria dos compostos possuir propriedades espectroscópicas facilmente mensuráveis, que dependem da natureza química do meio e são proporcionais à concentração do composto em cada uma das fases, acresce ainda a sensibilidade da técnica, que permite o uso de concentrações semelhantes às encontradas em sistemas naturais (41, 104). Assim, em condições de aplicabilidade da lei de Lambert-Beer, o K_p pode ser determinado a partir da seguinte equação (Equação 5):

$$Abs_T = Abs_a + \frac{(Abs_m - Abs_a)K_p[L]V_\phi}{1 + K_p[L]V_\phi} \quad \text{Equação 5}$$

sendo Abs_T , Abs_m e Abs_a a absorvância do composto total, em lípido e em água, respectivamente; K_p o coeficiente de partição (adimensional); $[L]$ a concentração de lípido (molL^{-1}) e V_ϕ o volume molar lipídico (Lmol^{-1}) (78). Sabendo a concentração de fármaco e a sua absorvância em fase aquosa (Abs_a), é possível calcular Abs_m a partir da curva Abs versus $[L]$ (102).

No entanto, a presença de estruturas micro-heterogêneas, de tamanhos não negligenciáveis, causa a dispersão da luz (97, 98, 103, 105, 106). Esta dispersão ocorre principalmente a comprimentos de onda inferiores a 300 nm, provocando uma diminuição da quantidade de luz que atinge o detector (41, 98, 107). A dispersão de luz é um problema comum em análise espectrofotométrica de amostras farmacêuticas e biológicas, e advém da presença de partículas em suspensão que interferem com a luz incidente. Podem considerar-se dois tipos de dispersão (108): dispersão de Rayleigh, que ocorre quando as partículas são pequenas comparativamente ao comprimento de onda (λ), e é inversamente proporcional à quarta potência de λ ; e dispersão de Tyndall, que ocorre quando as partículas são grandes, e é inversamente proporcional ao quadrado de λ .

Estas interferências espectroscópicas, bem como a absorvância das próprias microestruturas, dificultam grandemente a análise das variações da absorvância do fármaco, impedindo a correcta avaliação da sua partição (41). A separação dos agregados lipídicos por centrifugação, filtração por membranas, diálise ou cromatografia em coluna tem sido usada para obter soluções límpidas, sem o problema da dispersão de luz. Mas, para além da morosidade inerente, estas metodologias podem perturbar o equilíbrio do sistema. Diversos métodos foram desenvolvidos para eliminar a perturbação causada pela dispersão de luz sem recorrer a técnicas de separação, nomeadamente: o uso da subtracção de referências contendo a mesma concentração de microagregados; a modelação da dispersão; a análise multicomponente; e o recurso ao método da espectrofotometria derivativa, sendo este último um dos mais eficientes e de mais fácil aplicação (41, 97, 98, 105, 109). Efectivamente, a espectrofotometria derivativa apresenta várias vantagens relativamente à espectrofotometria de ordem zero, tais como: o facto de o equilíbrio não ser afectado; obtenção de uma melhor resolução das bandas sobrepostas; e eliminação das interferências espectrais da dispersão de luz (Figura 24) (41, 97, 98, 102, 110).

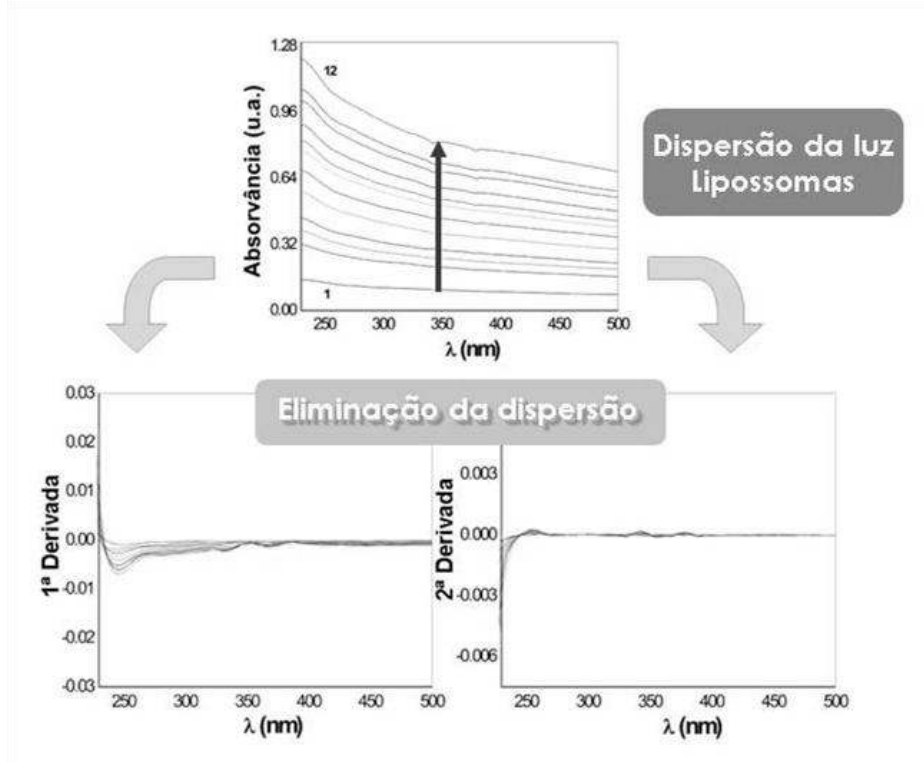


Figura 24 - Espectros de absorção (superior) e espectros de primeira (inferior esquerda) e segunda (inferior direita) derivadas de suspensões de lipossomas de concentrações crescentes. É visível que o espectro de segunda derivada anula a dispersão da luz causada pelos lipossomas.

A determinação do K_p por espectrofotometria derivativa é possível através da seguinte equação (Equação 6) (41, 78):

$$D = D_a + \frac{(D_m - D_a)K_p[L]V_\varphi}{1 + K_p[L]V_\varphi} \quad \text{Equação 6}$$

em que,

$$D = \frac{\delta^n Abs}{\delta^n \lambda} \quad \text{Equação 7}$$

sendo D_T , D_m e D_a os valores de derivadas da absorvância do composto total, em lípido e em água respectivamente; K_p o coeficiente de partilha (adimensional); $[L]$ a concentração de lípido (molL^{-1}) e V_φ o volume molar lipídico (Lmol^{-1}) (78). Sabendo a concentração de fármaco e a derivada da sua absorvância em fase aquosa (D_a), o cálculo do K_p efectua-se por ajuste da Equação 6 aos dados experimentais (D versus $[L]$) a partir de um método de regressão não linear, em que D_m e K_p são parâmetros ajustáveis (78, 111).

É possível o cálculo do K_p a partir dos valores da derivada a qualquer comprimento de onda, contudo, a sua escolha exige algum cuidado. O método do pico máximo é o aconselhado, de modo a aumentar a reprodutibilidade e razão sinal-ruído ou seja, os valores devem ser obtidos no $\lambda_{m\acute{a}x}$ do espectro de absorção, já que na sua vizinhança pequenas incorrecções não alteram grandemente os valores de ΔD (111). Mais uma vez, o facto da dispersão da luz ser mais importante a comprimentos de onda baixos e afectar preferencialmente as bandas fracas, reforça a necessidade de se obterem os valores no $\lambda_{m\acute{a}x}$ (111).

1.3.2.1.2 Espectrofluorimetria e espectrofluorimetria derivativa

Ao absorver luz de determinada energia (I_0), um fluoróforo, ou composto fluorescente, transita para um estado excitado singuleto e liberta essa energia em forma de luz ao regressar ao estado fundamental (I_f) (Figura 25). A absorção e libertação de luz por um fluoróforo permitem a obtenção dos seus espectros de excitação e emissão, respectivamente (80).

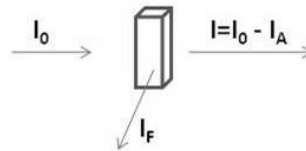


Figura 25 - Representação esquemática do fenómeno de emissão de fluorescência, em que a intensidade de luz absorvida (I_A) resultará em luz emitida (I_F).

O rendimento quântico (Φ) e o tempo de semi-vida de fluorescência (τ) são as principais características de um fluoróforo que podem ser alteradas, dependendo do microambiente onde o fluoróforo se insere, e definem-se por (80):

- **rendimento quântico (Φ)** – número de fótons emitidos (I_F) relativamente ao número de fótons absorvidos pelo fluoróforo (I_A) (Equação 8) (80);

- **tempo de semi-vida de fluorescência (τ)** – tempo dispendido pelo fluoróforo no estado excitado antes de regressar ao estado fundamental.

$$\phi = \frac{I_F}{I_A} \quad \text{Equação 8}$$

Uma outra característica importante, que pode ser alterada com o microambiente onde o fluoróforo se insere, é a **anisotropia de fluorescência (r)**. A anisotropia de fluorescência mede a difusão rotacional de uma molécula a partir da diferença na correlação de polarização em fluorescência. Esta correlação permite medir o tempo de rotação de uma molécula no seu conjunto, ou de uma parte da molécula em relação ao todo.

Assim, na presença de fármacos fluorescentes, a determinação do coeficiente de partição pode efectuar-se por espectrofluorimetria, desde que ocorra variação num destes parâmetros de fluorescência – rendimento quântico (Φ), anisotropia de fluorescência (r) ou tempo de semi-vida de fluorescência (τ) – devido à distribuição do fármaco pela membrana e/ou pela solução aquosa (97, 102, 110, 112-114). Na prática é possível o cálculo do K_p de um fármaco fluorescente entre as fases lipídica e aquosa, a partir da intensidade de fluorescência por ele emitida (Equação 9) (76, 78, 115):

$$I_T = I_a + \frac{(I_m - I_a)K_p [L]V_\phi}{1 + K_p [L]V_\phi} \quad \text{Equação 9}$$

A semelhança com a equação referida para a determinação do K_p por espectrofotometria é evidente, contudo, neste caso mede-se a intensidade de fluorescência de uma solução de determinada concentração de fármaco (I) em vez de absorvância, sendo que I_T , I_m , I_a são a intensidade de emissão de fluorescência do composto total, em lípido e em água, respectivamente (78).

Em paralelo ao que sucede com o espectro de absorção, também o espectro de emissão de fluorescência de um composto fluorescente pode ser alterado pelas propriedades do meio. Ou seja, a polaridade do microambiente que rodeia o fármaco, quando este se encontra distribuído pela fase aquosa e membranas, pode provocar desvios batocrómicos e hipsocrómicos no seu espectro de emissão (56).

São estas alterações na polaridade, de acordo com o meio onde o fármaco se distribui (meio aquoso ou membranas), que permitem a variação dos parâmetros de fluorescência do fármaco, possibilitando assim, a determinação do coeficiente de partição (100).

Apesar das semelhanças entre a determinação do K_p membrana/água por espectrofotometria UV-Vis e por espectrofluorimetria, esta última técnica é vantajosa, uma vez que os problemas relacionados com a detecção e análise em sistemas média ou

fortemente dispersivos são solucionáveis, nos casos em que a emissão de fluorescência ocorre a comprimentos de onda superiores a 300 nm, podendo dispensar a derivação dos espectros (108). No caso de ainda ser necessário, é possível recorrer também à derivação dos espectros de fluorescência para a anulação da dispersão da luz provocada pelos agregados lipídicos (Equação 10), para efectuar a determinação do K_p por espectrofluorimetria derivativa, em que (78):

$$D = \frac{\delta^n I}{\delta^n \lambda} \quad \text{Equação 10}$$

Os métodos derivativos de espectrofluorimetria apresentam, assim, as vantagens já apontadas para a espectrofotometria derivativa: o incremento da resolução das bandas espectrais sobrepostas; a eliminação das interferências da dispersão de luz; e o facto de não se perturbar o equilíbrio de partição, já que não é necessário separar a fase aquosa da fase lipídica (41).

Outras vantagens do uso da espectrofluorimetria e espectrofluorimetria derivativa na determinação do coeficiente de partição prendem-se com características da própria técnica, tais como: a elevada sensibilidade das técnicas de fluorescência; a especificidade das características da fluorescência dado o microambiente da molécula emissora; a capacidade de obter informação temporal e espacial da molécula emissora; e a utilização de baixas concentrações de fármaco (o que causa uma menor perturbação das membranas lipídicas) (102).

2. Avaliação da microviscosidade, cooperatividade e ordem por anisotropia em estado estacionário

2.1 Fluidez membranar

As biomembranas são estruturas dinâmicas e fluidas e, à temperatura corporal, os lípidos destas encontram-se num estado parcialmente ordenado, contudo, flexível, que permite movimentos laterais das moléculas lipídicas (15, 16, 41, 116). Diz-se, portanto, que as membranas biológicas são fluidas, mas o conceito de fluidez membranar é um conceito complexo que abrange propriedades biofísicas como a dinâmica, a microviscosidade e a ordem.

A **dinâmica membranar** é uma propriedade biofísica resultante dos movimentos moleculares lipídicos. A **rotação axial** é o movimento mais comum dos lípidos das membranas e consiste na rotação em torno da ligação C-C ao longo do eixo da cadeia de ácidos gordos. A rotação axial permite, aquando da transição de fase, a ocorrência dos movimentos que levam à formação de dobras (*kinks*). As cadeias hidrocarbonadas dos ácidos gordos podem, ainda, experimentar **movimentos de flexão** (15, 16, 31, 32, 35, 40).

A **difusão rotacional**, parâmetro que descreve o movimento rotacional, por sua vez, ocorre nas moléculas lipídicas completas (cauda apolar e cabeça polar) (15, 16, 31, 32, 35, 40).

A velocidade destes movimentos é elevada, com excepção da formação das dobras (*kinks*). Os movimentos de formação das dobras são os que mais influenciam a fluidez da membrana; já as rotações axiais e as flexões parecem não ter uma influência marcada para a fluidez (15, 16, 31, 32, 35, 40).

Um outro movimento que pode ocorrer na membrana é a **difusão lateral**. Esta difusão lateral consiste num movimento translacional da molécula lipídica, no plano da membrana, em que a molécula executa uma série de saltos para um local vago na estrutura líquido-cristalina. Importantes para definir a velocidade destes movimentos são a existência de proteínas na membrana e as moléculas de lípido imobilizadas (1, 15, 16, 31, 32, 35, 40).

O **flip-flop transmembranar** é um movimento em que há uma translocação de uma molécula lipídica de um folheto da bicamada para o outro folheto. Dado que é necessário vencer uma elevada barreira energética, porque as cabeças polares têm de atravessar o interior hidrofóbico da membrana, este movimento é mais lento (15, 16, 31, 32, 35, 40).

Na Figura 26 encontram-se representados de forma esquemática, os movimentos lipídicos na membrana.

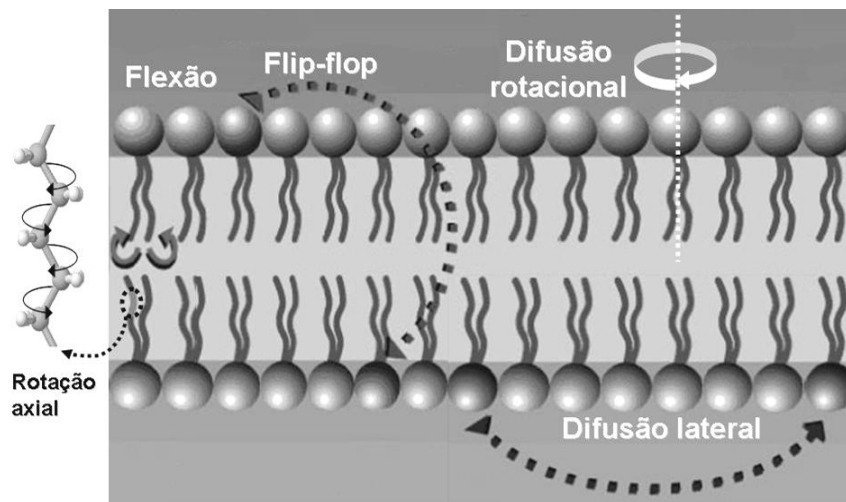


Figura 26 - Esquema representativo dos movimentos lipídicos na membrana.

Esta mobilidade que a membrana possui é muitas vezes associada a desordem. Esta associação é incorrecta, e a mobilidade exerce um papel fundamental na viabilidade da membrana. A fluidez e a ordem dinâmica são compatíveis, e resultam da heterogeneidade da membrana. De facto, tal como foi dito, a fluidez de natureza anisotrópica contém outros aspectos como a microviscosidade e a ordem das cadeias de ácidos gordos (37, 39).

A **microviscosidade** reporta-se à facilidade e velocidade a que ocorrem os movimentos anisotrópicos dos fosfolípidos, nomeadamente, a difusão rotacional e lateral. Forma-se, então, um gradiente de fluidez desde a superfície até o centro da bicamada lipídica, devido ao facto da velocidade rotacional ser maior nas extremidades das cadeias dos ácidos gordos e menor ao nível das cabeças hidrofílicas (15, 37, 39).

Quanto à **ordem**, que diz respeito à forma como as cadeias de ácidos gordos se aproximam dentro das distâncias de van der Waals (empacotamento), pode ser de dois

tipos: **ordem translacional** (ocorre entre cadeias hidrocarbonadas, condiciona o estado físico) e **ordem conformacional** (ocorre entre os folhetos da bicamada, condiciona a espessura da membrana) (37, 39).

A manutenção das propriedades biofísicas da membrana, através do complexo equilíbrio de movimentos moleculares, microviscosidade e ordem (que constituem no seu conjunto a fluidez membranar), é de extrema importância, dado que pode determinar o grau de penetração e a taxa de difusão lateral das proteínas membranares (41). A região hidrocarbonada da bicamada lipídica é a matriz hidrofóbica na qual se inserem as proteínas da membrana e, desta forma, a sua fluidez pode ser determinante nas interações proteína-lípido (41).

Assim sendo, a fluidez da membrana é importante para a sua permeabilidade, interação com moléculas endógenas e exógenas, e para os mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos farmacológicos de uma variedade de fármacos (15, 41). As interações fármaco-membrana podem conduzir a alterações nas propriedades biofísicas da membrana, sendo assim necessária a avaliação de tais efeitos. Dependendo do fármaco, este pode induzir diferentes perturbações nas propriedades biofísicas da membrana (moléculas polares ou carregadas podem interagir com a superfície das membranas, e moléculas lipofílicas podem penetrar no interior membranar) e, conseqüentemente, afectar a sua função biológica (77, 81). Como exemplo, as alterações de fluidez da membrana podem resultar em alterações nas propriedades catalíticas das enzimas ligadas às membranas (41).

Assim, os estudos de fluidez revelam-se fundamentais, já que podem permitir o esclarecimento de mecanismos biológicos, de condições patológicas (inflamação crónica, cancro e doenças cardiovasculares), avariar relações entre a capacidade de alterações de fluidez e a capacidade antioxidante dos fármacos, e conduzir a novas perspectivas de investigação (e.g. a citopatia do VIH e de outros vírus é reduzida por agentes fluidificantes da membrana) (41, 81, 117-119).

No âmbito desta dissertação recorreu-se à técnica de anisotropia de fluorescência em estado estacionário para avaliar a influência dos β -bloqueadores estudados na microviscosidade, cooperatividade e ordem membranar.

2.2 Anisotropia de fluorescência em estado estacionário

A anisotropia de fluorescência em estado estacionário fundamenta-se na determinação do grau e da extensão da rotação difusional do fluoróforo (sonda) durante o tempo de vida do estado excitado (1, 41, 80, 120, 121).

As alterações na anisotropia podem ocorrer devido a pequenas alterações na rigidez do meio onde a sonda se situa, provocando, assim, alterações no movimento rotacional desta (41). Estas alterações da anisotropia das sondas permitem avaliar a microviscosidade da membrana e, também, alterações nas transições de fase membranar, uma vez que as sondas membranares apresentam dinâmicas rotacionais distintas durante o estado excitado para ambientes lipídicos distintos (e.g. fase gel, fase fluida) (1, 76, 84).

Na determinação da anisotropia de fluorescência em estado estacionário, procede-se à excitação da amostra (que consiste num modelo membranar marcado com uma sonda) com luz polarizada vertical, e as intensidades de fluorescência são medidas com o polarizador analisador orientado paralelamente (I_{\parallel}) e perpendicularmente (I_{\perp}) em relação ao polarizador de excitação (80, 120).

Assim, a anisotropia em estado estacionário (r_{ss}) pode ser determinada através da seguinte relação (Equação 11) (76, 80, 84, 121):

$$r_{ss} = \frac{I_{\parallel} - GI_{\perp}}{I_{\parallel} + 2GI_{\perp}} \quad \text{Equação 11}$$

em que G é um factor de correcção instrumental, dado pela razão das sensibilidades do sistema de detecção para a luz polarizada vertical e horizontal quando a luz de excitação é polarizada na direcção horizontal (Equação 12) (80, 84, 120):

$$G = \frac{I_{\perp}}{I_{\parallel}} \quad \text{Equação 12}$$

A detecção do movimento dos fluoróforos por anisotropia de fluorescência (que é maior ou menor em função da microviscosidade do meio) baseia-se na excitação fotoselectiva dos fluoróforos, e faz-se pela presença dos polarizadores. Supondo que existia uma única molécula de fluoróforo orientada paralelamente em relação ao polarizador vertical de excitação, esta molécula iria ser excitada e, caso se mantivesse imóvel durante o

tempo de vida do estado excitado, então, a emissão de luz manter-se-ia polarizada. Se a molécula de fluoróforo rodasse durante o tempo de vida do estado excitado, então, deixaria de estar alinhada com o polarizador de excitação vertical e a emissão de luz polarizada diminuiria (80).

Consideremos, agora, a situação em que muitas moléculas de fluoróforo estão presentes numa membrana altamente ordenada (na fase gel ou cristalina), ou num solvente muito viscoso. Neste caso, de ambiente altamente restritivo ao movimento do fluoróforo, todas as moléculas estariam orientadas paralelamente ao polarizador de excitação vertical e, em virtude disso, todas as moléculas de fluoróforo seriam excitadas emitindo luz polarizada (80).

Já no caso do ambiente que rodeia o fluoróforo ser fluido, permitindo liberdade de rotação das moléculas de fluoróforo, estas teriam uma orientação aleatória. Com a incidência de luz polarizada verticalmente seriam apenas excitados os fluoróforos que estivessem orientados ao longo do vector eléctrico da luz incidente, logo, a emissão de luz polarizada diminuiria (Figura 27)(80).

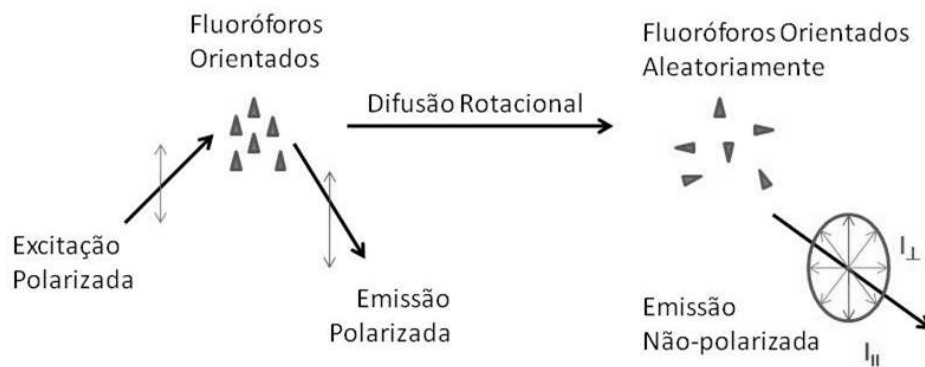


Figura 27 - Princípio da excitação fotoselectiva de fluoróforos excitados por luz polarizada. Adaptado de (80).

Resumindo, os movimentos rotacionais das sondas que provocam a despolarização de fluorescência dependem da viscosidade do solvente, do tamanho e da forma do fluoróforo. Para o mesmo fluoróforo incorporado numa membrana, é possível fazer a avaliação do grau de empacotamento molecular dos lípidos determinando a despolarização de fluorescência, através das medidas de anisotropia. Assim, quanto

menor a microviscosidade de uma membrana, maior será a rotação da sonda durante o tempo de vida do estado excitado e menor será a anisotropia de fluorescência (4, 122).

Na prática, a aplicação dos estudos de anisotropia em estado estacionário a modelos membranares permite a determinação da temperatura de transição de fase lipídica que, por sua vez, condiciona a fluidez da membrana. A essência desta técnica consiste no registo da anisotropia num intervalo de temperaturas, após a incorporação de uma sonda (DPH ou TMA-DPH) nos lipossomas. Esta determinação da temperatura de transição de fase lipídica realiza-se, ainda, na presença ou na ausência de uma quantidade conhecida de fármaco, cujo efeito na biofísica membranar se pretende estudar.

Obtêm-se, então, curvas sigmóides de variação da anisotropia em função da temperatura, e comparam-se as curvas obtidas para os lipossomas com fármaco e sem fármaco, de modo a evidenciar alterações: na temperatura de transição de fase; nos valores de anisotropia das zonas que se encontram antes e depois da temperatura de transição de fase; e, ainda, no perfil de transição (se mais suave ou mais abrupto) (85, 86, 123, 124).

Também é possível, a partir do perfil sigmóide obtido e do seu ponto de inflexão, calcular a cooperatividade e a T_m (temperatura de transição da fase de gel para a fase líquido-cristalina do lípido) através da Equação 13 (85, 89, 125):

$$r_{ss} = r_{s1} + p_1 T + \frac{r_{s2} - r_{s1} + p_2 T - p_1 T}{1 + 10^{B(1/T - 1/T_m)}} \quad \text{Equação 13}$$

em que T é a temperatura absoluta medida dentro da célula fluorimétrica, T_m é a temperatura de transição de fase principal do sistema membranar, B é a medida da cooperatividade, p_1 e p_2 correspondem ao declive das rectas obtidas nos patamares inicial e final do intervalo de temperaturas analisado; e r_{s1} e r_{s2} são a ordenada na origem dessas mesmas rectas.

As moléculas lipídicas empacotadas numa membrana lipídica não são livres de se desordenarem gradualmente mas, devido ao empacotamento forte, o aumento da rotação das cadeias dependente da temperatura é um processo cooperativo, dando origem a uma anomalia abrupta, a transição de fase. Quando se insere uma molécula estranha na região das cadeias acil há uma perturbação do processo cooperativo, e os lípidos apresentam uma desordem mais gradual, o que resulta num suavizar da transição de fase e uma diminuição da cooperatividade da transição (86). Casos há, no entanto, em

que a cooperatividade da transição aumenta na presença do fármaco, pelo que se pode inferir que este se encontra localizado no interior da bicamada lipídica (85, 89).

A figura seguinte representa um exemplo das informações que se podem retirar das curvas de perfil sigmóide e dos ajustes efectuados.

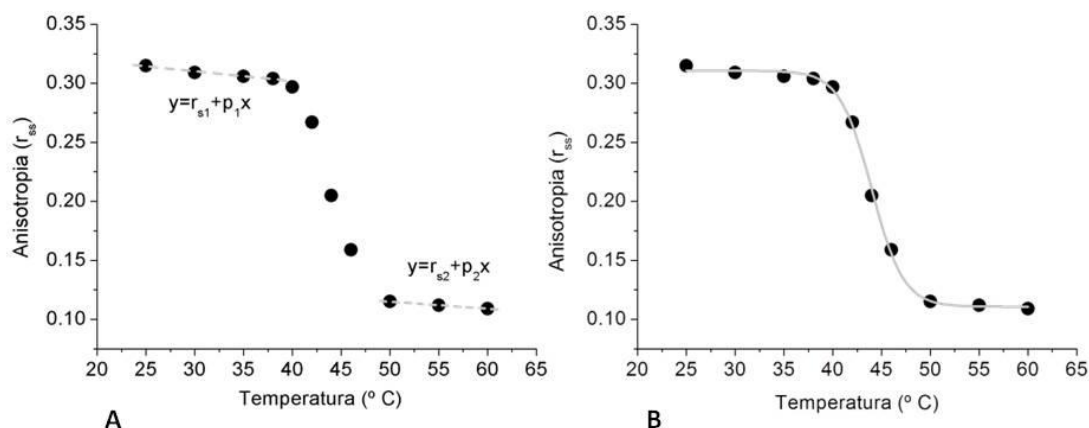


Figura 28 – Curvas de perfil sigmóide representando em A a forma de determinação dos parâmetros r_{s1} , p_1 e r_{s2} e p_2 , correspondentes, respectivamente, à recta inicial antes da transição de fase e à recta final depois da transição de fase. Após determinação destes parâmetros, na Figura B, é mostrado o ajuste não linear de acordo com a Equação 13 refinando os parâmetros T_m e cooperatividade (B).

A partir dos valores de r_{ss} é possível determinar o valor da anisotropia limitante (r_{∞}) através da seguinte equação, válida para valores de r_{ss} compreendidos entre 0,13 e 0,28 (125):

$$r_{\infty} = 4/3r_{ss} - 0,10 \quad \text{Equação 14}$$

O valor da anisotropia limitante reflecte a restrição dos movimentos da sonda, e pode ser convertido no parâmetro ordem (S), determinado através da seguinte equação:

$$S = \sqrt{r_{\infty} / r_0} \quad \text{Equação 15}$$

onde r_0 é a anisotropia na ausência de qualquer movimento rotacional do fluoróforo (125).

A técnica de anisotropia de fluorescência é, portanto, muito útil na avaliação da fluidez membranar, pela informação que fornece acerca da microviscosidade do ambiente lipídico onde a sonda está inserida e tem sido, inclusivamente, aplicada para avaliar

patologias e a acção terapêutica de fármacos. Por exemplo, através de estudos de anisotropia de fluorescência verificou-se que doentes com artrite reumatóide activa (com dor) possuem um aumento da rigidez das membranas dos linfócitos. Por sua vez, usando a mesma técnica, verificou-se que os fármacos usados no tratamento desta doença induzem o aumento da fluidez da membrana dos linfócitos, sugerindo que o estudo das alterações da fluidez da membrana possa ser usado para monitorizar a eficácia do tratamento dos fármacos (126).

3. Avaliação da ligação à membrana por estudos de fluorescência com a sonda ANS

ANS é uma sonda aniônica que fluoresce apenas quando se liga electrostaticamente com a região das cabeças polares dos fosfolípidos (125).

O conhecimento desta propriedade permitiu o desenvolvimento de uma técnica de estudo da ligação da sonda à membrana na ausência e presença de fármacos, com os seguintes objectivos: (i) investigar se os fármacos estudados apresentam um mecanismo de competição para os mesmos locais de ligação da sonda ANS à bicamada lipídica; (ii) obter parâmetros de associação da sonda ANS à membrana e avaliar como esses parâmetros de associação são alterados na presença de fármacos, e (iii) determinar as variações do potencial de superfície membranar (89).

Assim, como resultado da adição do fármaco ao meio lipossómico é possível ocorrer uma competição entre a sonda ANS (marcador fluorescente usado para estudar o meio hidrofílico constituído pelas cabeças dos fosfolípidos) e o fármaco. Esta competição pode surgir como consequência de uma interacção electrostática entre o fármaco e os fosfolípidos das bicamadas. A ligação do fármaco à membrana afecta a afinidade da sonda para os locais de ligação na membrana e provoca uma diminuição da intensidade de fluorescência de emissão (85, 125).

Na prática procede-se a uma incubação dos fármacos a estudar com lipossomas, e a estas suspensões são adicionadas quantidades crescentes de solução concentrada de ANS em etanol. A cada adição da sonda ANS avalia-se a sua adsorção à membrana através do aumento da intensidade de fluorescência, até se obter uma estabilização da fluorescência (89). Como termo de comparação, procede-se ao mesmo estudo de adições crescentes de sonda ANS aos lipossomas na ausência de fármaco, obtendo-se perfis de adsorção semelhantes ao da Figura 29:

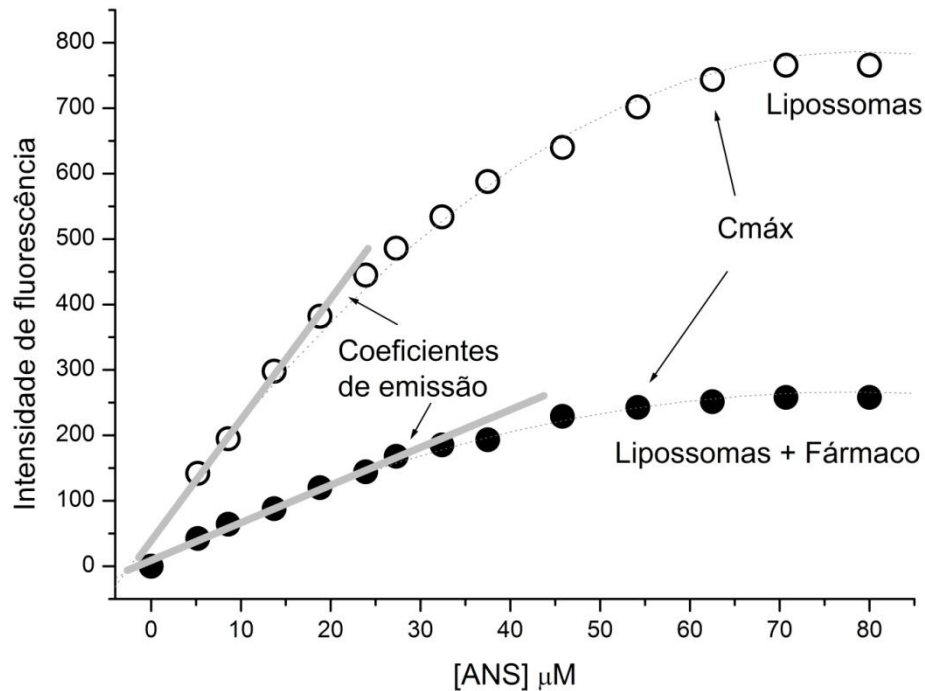


Figura 29 – Representação esquemática dos perfis de adsorção da sonda ANS à membrana de lipossomas obtidos na ausência (círculos brancos) e presença de um fármaco (círculos a preto) que compete para os mesmos locais de ligação da sonda à membrana. A cinza são representadas as zonas lineares dos perfis de adsorção cujo declive permite determinar os coeficientes de emissão. $C_{\text{máx}}$ representa a intensidade máxima de fluorescência correspondente à concentração máxima de sonda ligada à membrana.

Para avaliar se existe um mecanismo de competição para os mesmos locais de ligação da sonda ANS são efectuadas as determinações dos coeficientes de emissão, calculados pelo declive da zona linear da variação da intensidade de fluorescência, em função da concentração de ANS (127). Uma diminuição do coeficiente de emissão da sonda ANS, quando se encontra na presença de fármaco, é indicativa de um mecanismo competitivo do fármaco para os mesmos locais de ligação da sonda à membrana.

Para determinar os parâmetros de associação da sonda ANS à membrana, e avaliar como esses parâmetros de associação são alterados na presença de fármacos, procede-se a um ajuste dos dados da adsorção do fluoróforo ANS às bicamadas, na presença e na ausência de fármaco (Figura 29) de acordo com uma isotérmica de Freundlich (Equação 16) (85, 89):

$$[ANS]_B = C_{m\acute{a}x} \frac{(K[ANS]_{\infty})^b}{1 + (K[ANS]_{\infty})^b} \quad \text{Equação 16}$$

em que K é a constante de dissociação da sonda à bicamada lipídica (inversamente proporcional à constante de ligação), $C_{m\acute{a}x}$ é a concentração máxima de sonda ligada aos lipossomas (proporcional à intensidade de fluorescência máxima obtida – Figura 29), b corresponde à cooperatividade do processo de ligação do fluoróforo à membrana e os índices B e ∞ referem-se às concentrações de sonda ANS ligada e livre, respectivamente.

Finalmente, é possível determinar as variações do potencial de superfície membranar induzidas pelo fármaco em estudo. Estas variações do potencial de superfície membranar são, assim, calculadas a partir dos valores da constante aparente de ligação da sonda ANS à membrana na ausência (K_{app}) e na presença (K'_{app}) de diferentes quantidades de fármaco através da equação seguinte (Equação 17) (85):

$$\Delta\Psi = \frac{RT}{F} \ln\left(\frac{K'_{app}}{K_{app}}\right) \quad \text{Equação 17}$$

em que R é a constante dos gases perfeitos, T é a temperatura e F é a constante de Faraday.

4. Avaliação do efeito no tamanho e na carga membranar por determinação do potencial zeta por dispersão de luz dinâmica

Tal como já foi referido, na análise da interacção fármaco-membrana é conveniente a utilização de modelos membranares que mimetizem, de uma forma mais simples, a complexidade da membrana biológica. Os lipossomas são vesículas lipídicas muito usadas como modelos membranares e também como nanossistemas na veiculação de fármacos. Quer os lipossomas se destinem a servir de modelos miméticos da membrana com aplicações no estudo da interacção com os fármacos, quer se destinem a ser usados em nanoterapia, é necessário proceder à sua caracterização. Esta caracterização está centrada no conhecimento do tamanho das vesículas lipídicas e na determinação da carga da sua superfície (128). Estas determinações são importantes pois, para além de permitirem a caracterização dos lipossomas, possibilitam também avaliar a interacção fármaco-membrana. A partir do potencial zeta é possível, por exemplo, entender a estabilidade electrostática de uma dispersão coloidal e a morfologia da superfície das partículas (128). Além disso, é possível determinar o coeficiente de partição de um fármaco e averiguar se o mesmo tem influência no potencial de membrana, se este potencial for alterado após o contacto do fármaco com a membrana.

As propriedades eléctricas da superfície dos lipossomas podem ser estudadas por microelectroforese, em que o movimento dos lipossomas num campo eléctrico é observado por um microscópio. Nesta técnica, um laser de baixa potência de hélio-néon é usado para produzir dois feixes coerentes que se intersectam na suspensão, produzindo barras de interferência. Os lipossomas movimentam-se pelas barras, sob a influência de um campo eléctrico, e dispersam a luz. A intensidade da luz dispersa flutua a uma frequência relacionada com a velocidade do lipossoma. A velocidade real das vesículas depende da carga da partícula, da viscosidade do meio e do potencial aplicado (78). A luz dispersa é analisada por uma correlação digital para fornecer um espectro de frequências, de onde se pode determinar a distribuição da mobilidade electroforética dos lipossomas (41, 129). A medição das mobilidades electroforéticas é relativamente simples, contudo, a sua interpretação pode ser um pouco problemática. Geralmente, podem calcular-se dois parâmetros que caracterizam a superfície dos lipossomas a partir das mobilidades determinadas: o potencial eléctrico, ou potencial zeta; e a densidade de carga de superfície (129).

O **potencial zeta** é calculado directamente a partir da mobilidade determinada pela equação de Henry (Equação 18) (129):

$$\xi = \frac{3\eta u}{2\varepsilon_0\varepsilon_r f(\kappa a)} \quad \text{Equação 18}$$

em que ξ é o potencial zeta, η é a viscosidade do meio, u é a mobilidade, ε_0 é a permissividade do espaço livre, ε_r é a constante dielétrica do meio, κ é o parâmetro de Debye e a é o raio do lipossoma. Como a força iónica influencia o parâmetro de Debye, vai, por sua vez, influenciar o potencial zeta. O recíproco do parâmetro de Debye pode ser usado como uma medida da espessura da bicamada lipídica (129). A razão da determinação do potencial zeta prende-se com o facto de não existir uma técnica satisfatória para determinar a carga de superfície para pequenas partículas em líquidos. A prática comum é a determinação do potencial eléctrico de uma partícula num local próximo da superfície da mesma, na camada difusa (plano de corte), ou seja, a determinação do potencial zeta (Figura 30) (128).

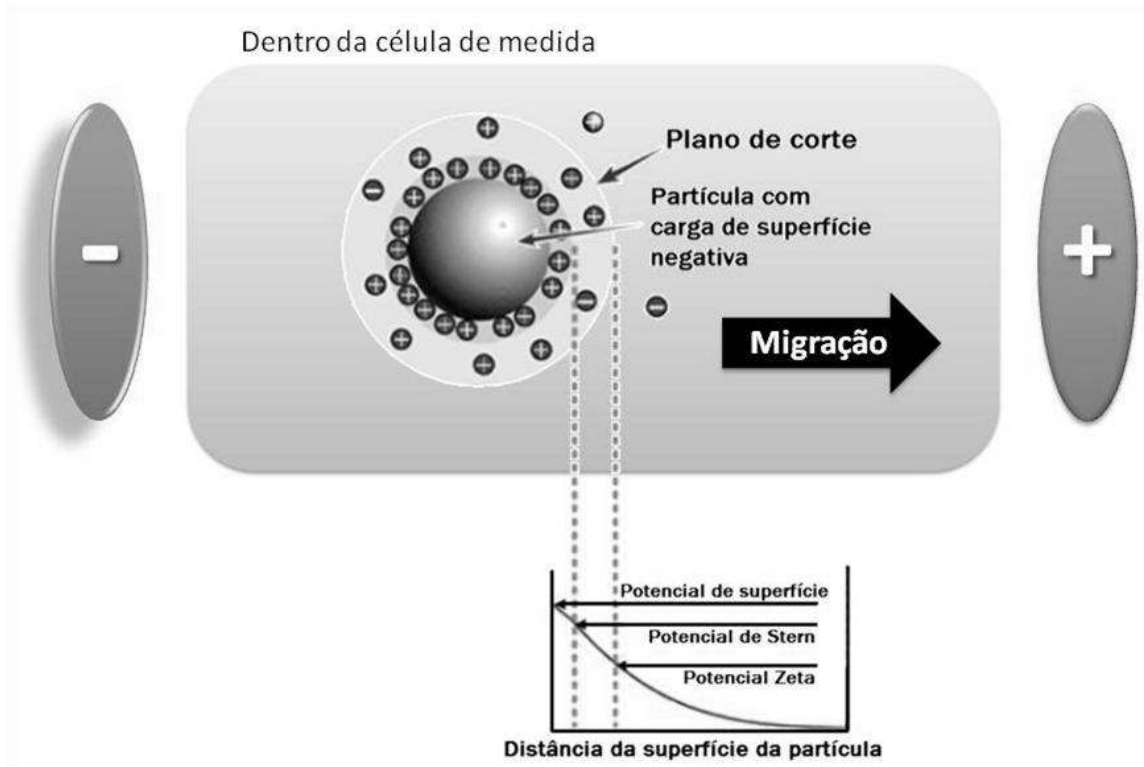


Figura 30 - Representação da dupla camada eléctrica e da variação do potencial zeta com a distância de uma partícula carregada negativamente.

Assim, o potencial zeta não é a carga efectiva da partícula, mas é definido como a carga que uma partícula adquire num meio particular e depende do pH, força iónica ou da concentração de um determinado componente.

Apesar do potencial zeta ser uma propriedade bem definida, é possível encontrarem-se diferentes valores do potencial zeta para interfaces supostamente idênticas. Muitas vezes, as superfícies não são, de facto, semelhantes (a área elevada e a reactividade superficial das partículas faz com que estas sejam muito sensíveis às impurezas). Por outro lado, dado que o potencial zeta não é uma propriedade directamente mensurável, o modelo utilizado nos cálculos de conversão do sinal electrocinético em potencial zeta pode não ser o mais adequado. O modelo utilizado deve ser seleccionado criteriosamente, tendo em conta o rigor que se pretende. Frequentemente, não se requer uma elevada sofisticação do modelo quando se procura obter rapidamente os valores de potencial zeta, por exemplo, quando em controlo de qualidade se pretendem detectar variações no estado eléctrico da interface, e não obter valores exactos do potencial zeta. Em outras situações, quando se pretende comparar valores de potencial zeta obtidos por diferentes técnicas, é necessário obter valores de potencial zeta com maior exactidão (130).

Para determinar o tamanho dos lipossomas utilizam-se técnicas de **dispersão de luz dinâmica** (*dynamic light scattering* ou DLS), que medem flutuações na intensidade da luz dispersa, dependentes do tempo, que ocorrem devido às partículas apresentarem movimentos aleatórios (movimentos Brownianos) (41, 128). Uma característica importante do movimento Browniano é o facto de as partículas pequenas moverem-se mais rapidamente que as partículas maiores. Ou seja, partículas maiores movem-se mais lentamente e espalham mais o laser. Partículas menores movem-se mais rapidamente e espalham menos o laser. A relação entre o tamanho da partícula (raio hidrodinâmico, R_H) e a sua velocidade devido ao movimento Browniano é definida pela equação de Stokes-Einstein (Equação 19):

$$R_H = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad \text{Equação 19}$$

em que k é a constante de Boltzmann; T é a temperatura absoluta; η é a viscosidade; D é o coeficiente de difusão translacional. A análise destas flutuações de intensidade permite a determinação de coeficientes de distribuição da difusão das partículas (D), que são, posteriormente convertidos numa distribuição do tamanho. As variações da intensidade da difracção da luz são tanto mais rápidas quanto maiores as vesículas (78). Esta técnica

tem sido utilizada na medição de macromoléculas e de pequenas partículas em suspensões diluídas (128).

Contudo, há sempre interações partícula-partícula, de modo que os movimentos Brownianos não são movimentos puros, mas sim, afectados ou restringidos por estas interações. Devido à existência destas interações entre partículas, os coeficientes de difusão medidos não são propriedades individuais de uma partícula, mas sim, propriedades da suspensão total das partículas (128).

As técnicas de dispersão de luz dinâmica permitem conhecer o tamanho médio das partículas e a sua distribuição. É, então, possível saber se as populações de lipossomas estão uniformemente distribuídas numa ou mais famílias de tamanhos. O índice de polidispersão avalia o grau de heterogeneidade da amostra e, o seu valor é tanto maior quanto maior o intervalo de diâmetros entre os quais se situa o diâmetro médio. Este índice situa-se entre 0 e 1. Por isso, estas técnicas possibilitam não só a caracterização das suspensões lipossómicas, mas também a verificação da estabilidade destas ao longo do tempo (78).

IV. Métodos experimentais e resultados

1 Preparação dos lipossomas unilamelares

Devido à utilização diversificada dos lipossomas surgiu a necessidade de desenvolver métodos de preparação que fossem relativamente simples, eficientes e reprodutíveis, à escala industrial e laboratorial. No âmbito desta dissertação, a preparação vai cingir-se à preparação de lipossomas, mais especificamente de LUVs, à escala laboratorial.

Dado que a composição química, o número de camadas, a distribuição de tamanhos, o número de lamelas e o volume encapsulado influenciam significativamente qualquer aplicação dos lipossomas, o seu método de preparação deve ser escolhido criteriosamente, já que esta preparação condiciona o tipo de lipossoma. Genericamente, a preparação de vesículas lipídicas pelo método clássico de hidratação do filme lipídico pode ser dividida em três fases: preparação das fases aquosa e lipídica, hidratação do lípido e, para a generalidade dos sistemas, um processamento secundário, necessário para a obtenção do produto final (26, 131).

Inicialmente, procede-se à preparação de MLVs, em que, após a escolha da composição lipídica (EPC ou DPPC, adquiridas à Sigma Chemical Co e Avanti Polar Lipids, respectivamente, e usadas sem purificação adicional) e da solução aquosa a utilizar (solução tampão HEPES; 10 mM; pH = 7,4; $I = 0,1M$ com NaCl) de acordo com o objectivo do trabalho, faz-se a dissolução do lípido. Neste passo, o lípido (seco) é dissolvido num solvente, ou mistura de solventes, orgânicos que sejam eficientes na dissolução e, simultaneamente, suficientemente voláteis (e.g., clorofórmio, mistura clorofórmio-metanol). Os volumes adequados das soluções lipídicas, tendo em conta o volume e concentração dos componentes da suspensão de vesículas pretendidos, são adicionados num balão de fundo redondo (78). Seguidamente, recorre-se a um fluxo de azoto para evaporar à secura o solvente orgânico, sujeitando o balão a uma rotação que permita formar um filme lipídico tão fino quanto possível. O filme obtido é colocado sob vácuo durante cerca de 12 horas, a fim de eliminar qualquer vestígio de solvente (41, 78).

A fase seguinte, que compreende a hidratação do lípido, inicia-se com a adição, ao balão contendo o filme lipídico, do volume desejado de solução aquosa seleccionada (neste caso, solução tampão HEPES; 10 mM; pH = 7,4; $I = 0,1M$ com NaCl), previamente

aquecida a temperatura acima da temperatura de transição de fase do fosfolípido. Pretende-se, nesta fase, obter o desprendimento total do filme lipídico das paredes do balão e, para tal, recorre-se a agitação alternada com aquecimento da suspensão em banho a temperatura superior à temperatura de transição de fase do lípido (este aquecimento torna-se desnecessário no caso de se trabalhar com EPC, dado que já se encontra na fase fluida à temperatura ambiente – T_m entre -15 e -7°C). A agitação tem de ser cautelosa de modo a não formar espuma (que dificulta a posterior medição rigorosa de um determinado volume lipídico) e, para isso, a agitação inicial é manual, em círculos lentos, sendo a intensidade desta aumentada até à utilização do vórtex. Com esta operação, e ficando as paredes do balão livres de filme lipídico, obtém-se uma suspensão de MLVs (41, 78, 132)

Tendo como ponto de partida a suspensão de vesículas multilamelares (MLVs) obtida pelo processo até aqui descrito, a obtenção de vesículas unilamelares grandes (LUVs) é conseguida por extrusão da suspensão de MLVs (133). Nesta fase, utiliza-se um extrusor termostaticado (e.g., por circulação interna de água), em que se mantém a temperatura acima da temperatura de transição de fase (134). A extrusão é feita sob pressão de azoto (aproximadamente 30 bar), utilizando filtros com poros de 100 nm de diâmetro (usualmente de policarbonato). Após a montagem do extrusor, e imediatamente antes da introdução da amostra, executam-se uma a três extrusões com a solução aquosa de tampão utilizada. O processo subsequente comporta dez ciclos de aquecimento da suspensão lipídica acima da temperatura da transição de fase (em banho de água ou no próprio extrusor), seguidos da extrusão da suspensão. Podem ser necessárias, tendo em conta o tipo de amostra ou, nos casos de concentrações elevadas de lípido, extrusões prévias utilizando filtros de poro mais largo (e.g., 600 e 400 nm). Estas várias passagens da suspensão de MLVs pelo extrusor provocam a diminuição do número de lamelas e, no fim das dez passagens, os lipossomas encontram-se predominantemente homogéneos e unilamelares. É o tamanho do poro do filtro utilizado que determina o diâmetro final dos lipossomas (1, 41, 78, 132).

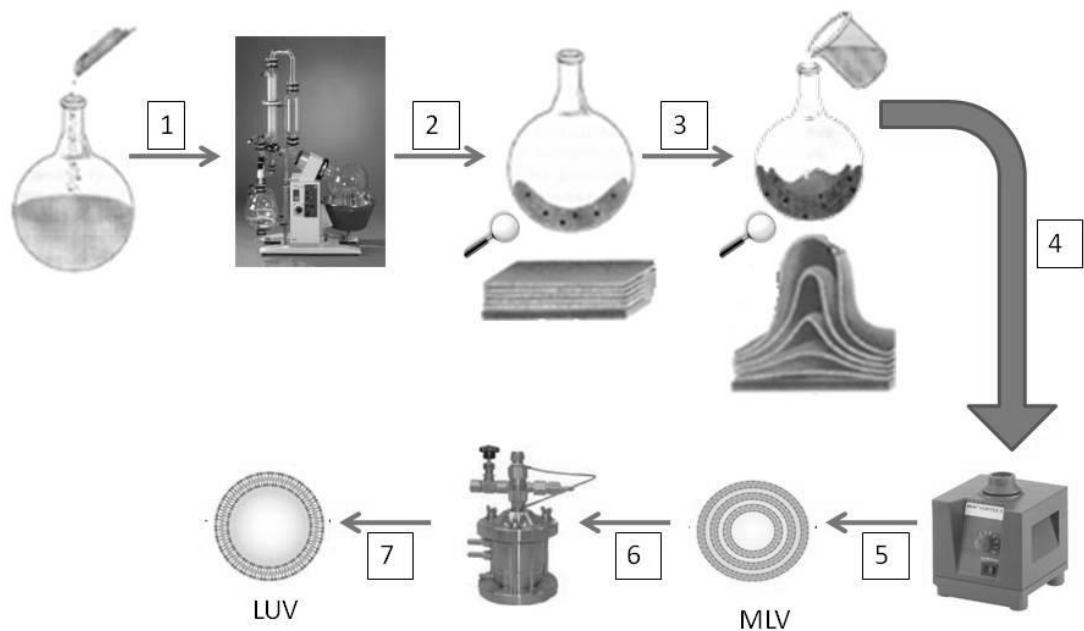


Figura 31 – Esquema representativo da preparação de LUVs. (1) Evaporação dos solventes; (2) Filme lipídico seco (obtenção de lamelas); (3) Hidratação do filme lipídico; (4) Agitação mecânica; (5) Obtenção de MLVs; (6) Extrusão; (7) Obtenção de LUVs.

Uma consideração importante a ter em conta, é o facto de ser necessária a manipulação dos lípidos, que vão dar origem aos lipossomas, a uma temperatura acima da T_m . É necessária esta temperatura superior para que as moléculas de água penetrem as camadas lipídicas e, então, permitam a formação da estrutura do lipossoma. Após a formação do lipossoma, a temperatura pode depois voltar para valores inferiores à T_m , não ocorrendo alteração da estrutura do mesmo (22).

Preparação de lipossomas unilamelares com incorporação de sondas

A preparação dos lipossomas é em tudo idêntica ao processo referido acima, com a única alteração da dissolução da sonda de fluorescência a utilizar (DPH, TMA-DPH) conjuntamente com o lípido na fase orgânica.

Para tal, utiliza-se um volume da sonda, dissolvida em clorofórmio-metanol (3:2), que é adicionado ao lípido já dissolvido, de modo a obter uma proporção final de lípido/sonda de 300:1. Esta proporção permite prevenir alterações na estrutura da bicamada (26, 45). A adição da sonda terá de ser executada recorrendo a agitação suave e seguida de uma incubação de 30 minutos à temperatura ambiente. Após esta incubação, retoma-se o processo acima descrito com a evaporação dos solventes (112, 135).

É de ressaltar que, desde que se procede à adição da sonda até terminar o trabalho que se pretende realizar, é necessário que, quer o armazenamento, quer o manuseamento da suspensão lipídica se façam ao abrigo da luz.

2 Estudos prévios dos fármacos

2.1 Propranolol

2.1.1 Estrutura química e características de solubilidade e ionização

O propranolol (Figura 32) é um membro da família dos β -bloqueadores que se encontra na forma de cristais, sendo o seu peso molecular de $259,3 \text{ g mol}^{-1}$, e o seu ponto de fusão de 94 a 96°C . Este fármaco também está disponível como cloridrato de propranolol, de peso molecular de $295,8 \text{ g mol}^{-1}$, e ponto de fusão de 164°C . É uma substância que se encontra sob a forma de pó branco, inodora e cristalina. O propranolol é solúvel em água e etanol, ligeiramente solúvel em clorofórmio, e praticamente insolúvel em éter.

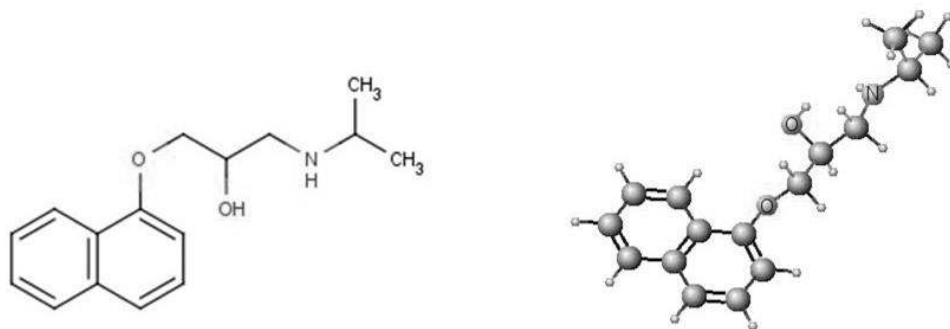


Figura 32 - Estrutura química planar e respectiva projecção tridimensional do propranolol (1-(isopropilamina(-3-(naftaleno-1-iloxi) propano-2-ol))).

A Tabela 6 resume as características físico-químicas do propranolol.

Tabela 6 – Propriedades físico-químicas do propranolol. Os valores em a) foram obtidos na literatura (136); em b) obtido por cálculo através de um programa Marvin sketch calculator da ChemaxonTM; e em c) foram obtidos na literatura (137).

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO PROPRANOLOL

Fórmula molecular	C ₁₆ H ₂₁ NO ₂
Peso molecular (g/mol)	259.34
Ponto de fusão	94 a 96°C
Solubilidade em água	Solúvel
pKa	9,24 ^a ; 9,67 ^b
logP	2,65 ^c
logD (a pH 7,4)	0,36 ^b

Uma vez que os estudos foram realizados a pH 7,4 e com a força iônica ajustada a 0,1 M, sendo estas as características fisiológicas do soro, foi necessário calcular as formas iônicas mais prováveis do propranolol. Assim, nestas condições, este fármaco apresenta-se 99,46% carregado positivamente e apenas 0,54% na forma neutra (Figura 33).

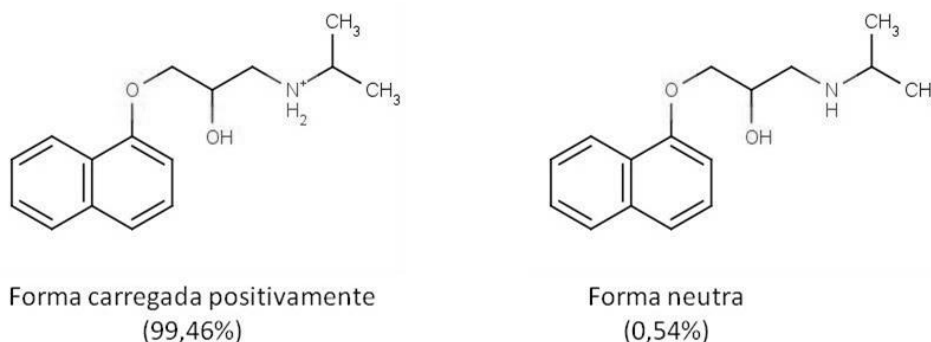


Figura 33 - Distribuição das microespécies de propranolol a pH 7,4.

2.1.2 Verificação da lei de Lambert-Beer em UV-Vis e fluorescência

Partindo de soluções de propranolol com concentrações crescentes, previamente preparadas por pesagem rigorosa e dissolução em tampão HEPES (pH 7,4; I=0,1 M), procedeu-se ao traçado dos respectivos espectros de absorvância UV-Vis que apresentaram máximos de absorção a 289 e 319 nm (Figura 34):

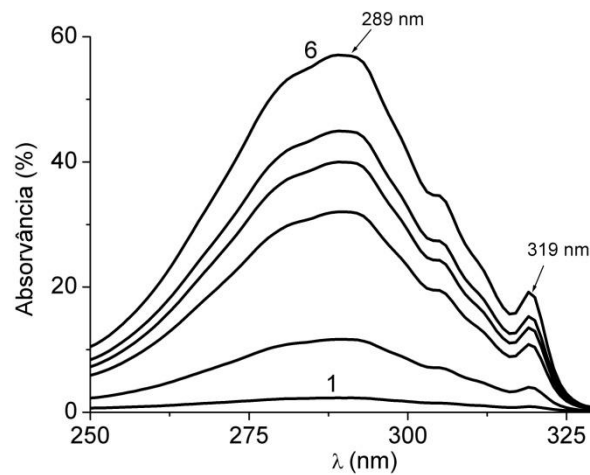


Figura 34 – Espectros de Absorção UV-Vis de padrões de propranolol com concentrações (μM): 4 (1); 22 (2); 61 (3); 76 (4); 85 (5); 108 (6).

Para cada máximo de absorção procedeu-se à verificação da lei de Lambert-Beer (Figura 35), concluindo-se que para $\lambda = 289$ e 319 nm a resposta é linear no intervalo de concentrações de 0 a $108 \mu\text{M}$.

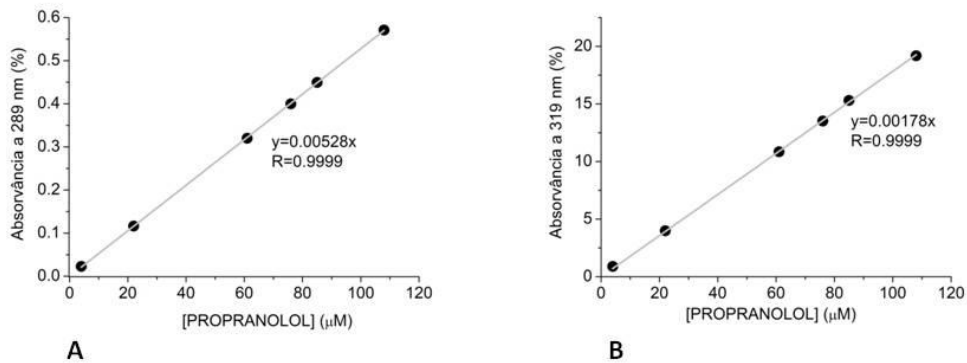


Figura 35 – Zona linear da lei de Lambert-Beer para o $\lambda_{\text{máx}}$ de 289 (A) e 319 (B) nm para padrões de propranolol com concentrações (μM): 4 (1); 22 (2); 61 (3); 76 (4); 85 (5); 108 (6).

A determinação da zona linear da lei de Lambert-Beer foi importante para definir as concentrações de fármaco a utilizar nos ensaios posteriores, utilizando-se sempre uma concentração intermédia, de forma a garantir que existe permanentemente uma proporcionalidade entre absorvância e concentração.

Partindo de soluções de propranolol com concentrações crescentes, previamente preparadas por pesagem rigorosa e dissolução em tampão HEPES (pH 7,4; $I=0,1$ M),

procedeu-se ao traçado dos respectivos espectros de excitação e de emissão de fluorescência que apresentaram máximos a 287 e 350 nm, respectivamente (Figura 36):

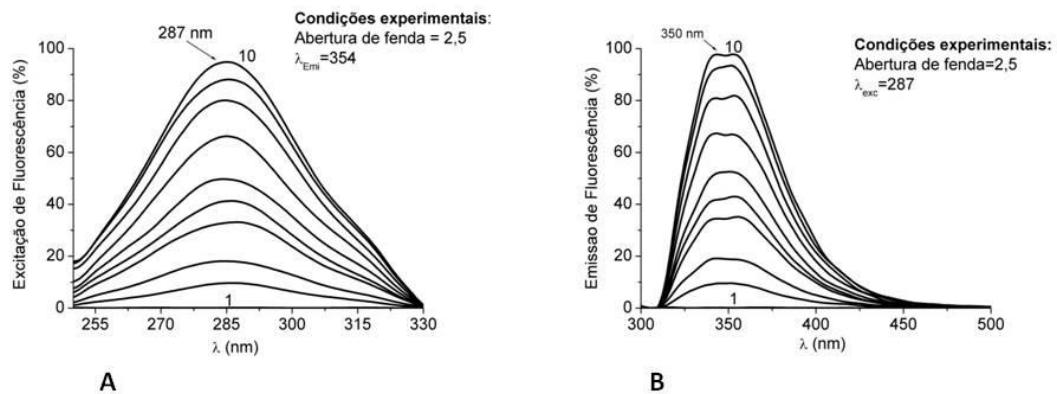


Figura 36 – Espectros de excitação (A) e emissão (B) de fluorescência de padrões de propranolol com concentrações (μM): 0 (1); 1,35 (2); 2,7 (3); 5,4 (4); 6,48 (5); 8,1 (6); 10,8 (7); 13,5 (8); 15,12 (9); 16,2 (10).

Para o máximo de emissão de fluorescência procedeu-se à verificação da lei de Lambert-Beer (Figura 37), concluindo-se que para $\lambda = 350 \text{ nm}$ a resposta é linear no intervalo de concentrações de 0 a $16,2 \mu\text{M}$.

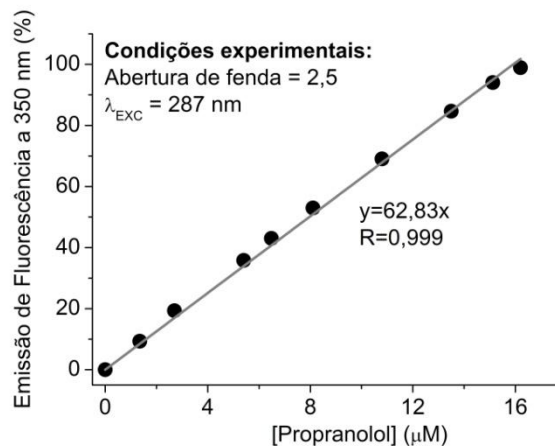


Figura 37 - Zona linear da lei de Lambert-Beer para o $\lambda_{m\acute{a}x}$ de 350 nm para padrões de propranolol com concentrações (μM): 0 (1); 1,35 (2); 2,7 (3); 5,4 (4); 6,48 (5); 8,1 (6); 10,8 (7); 13,5 (8); 15,12 (9); 16,2 (10).

A determinação da zona linear da lei de Lambert-Beer foi importante para definir as concentrações de fármaco a utilizar nos ensaios posteriores, recorrendo-se sempre a

uma concentração intermédia, de forma a garantir que existe permanentemente uma proporcionalidade entre emissão de fluorescência e concentração.

Como o propranolol apresenta uma grande intensidade de fluorescência, só foi possível trabalhar com sondas fluorescentes definindo bem as condições de trabalho, e certificando-se que a excitação da sonda não provocaria uma emissão do fármaco. Apresenta-se na figura seguinte (Figura 38) um exemplo onde se podem verificar os espectros de excitação de fluorescência do fármaco e os espectros de excitação e emissão de fluorescência da sonda. Assim, seleccionou-se o comprimento de onda de excitação da sonda ($\lambda=360$ nm) e confirmou-se que, usando este comprimento de onda de excitação, não se obtinha qualquer emissão do fármaco.

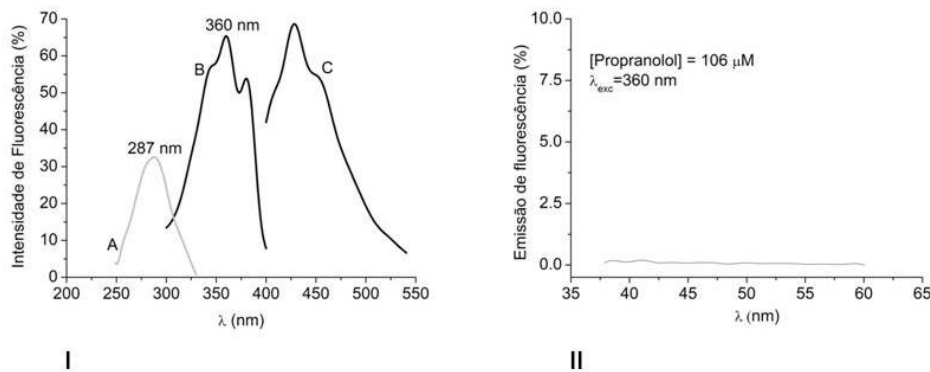


Figura 38 – I) Espectros de excitação de fluorescência do propranolol (A) e da sonda (B), e espectro de emissão de fluorescência da sonda (C). II) Emissão de fluorescência do propranolol quando a excitação é feita ao $\lambda_{máx}$ de excitação da sonda (360 nm).

2.2 Acebutolol

2.2.1 Estrutura química e características de solubilidade e ionização

O acebutolol (Figura 39) é também um membro da família dos β -bloqueadores que, na forma de cristais, apresenta um peso molecular de $336,4 \text{ g mol}^{-1}$ e ponto de fusão de 119 a 123°C . Também está disponível como cloridrato de acebutolol, com peso molecular de $372,9 \text{ g mol}^{-1}$ e ponto de fusão de 141 a 144°C . É uma substância que se encontra sob a

forma de pó branco e cristalino, e deve manter-se ao abrigo da luz. Mostra-se solúvel em água e em álcool, ligeiramente solúvel em acetona e diclorometano, e praticamente insolúvel em éter.

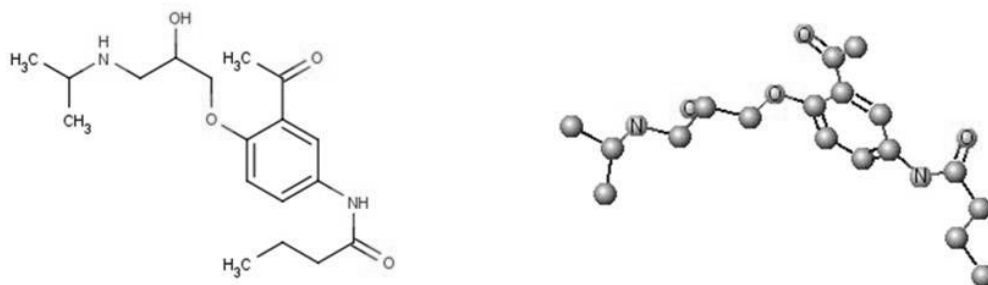


Figura 39 - Estrutura química planar e respectiva projecção tridimensional do acebutolol (N-[3-acetil-4-(2-hidroxi-3-propan-2-ilamino-propoxi)-fenil]butanamida).

A Tabela 7 resume as características físico-químicas do acebutolol.

Tabela 7- Propriedades físico-químicas do acebutolol. Os valores em: a) foram obtidos a partir da literatura (138); b) valor calculado através de um programa Marvin sketch calculator da ChemaxonTM; e c) valor obtido na literatura (139).

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO ACEBUTOLOL

Fórmula molecular	$C_{18}H_{28}N_2O_4$
Peso molecular (g/mol)	336,426
Ponto de fusão	119-123°C
Solubilidade em água	Solúvel
pKa	9,2 – 9,6 ^a ; 9,57 ^b
logP	1,81 ^c
logD (a pH 7,4)	-0,60 ^b

Uma vez que os estudos foram realizados a pH 7,4 e com a força iónica ajustada a 0,1 M, sendo estas as características fisiológicas do soro, foi necessário calcular as formas iónicas mais prováveis do acebutolol. Assim, nestas condições, este fármaco apresenta-se 99,32% carregado positivamente e apenas 0,68% na forma neutra (Figura 40).

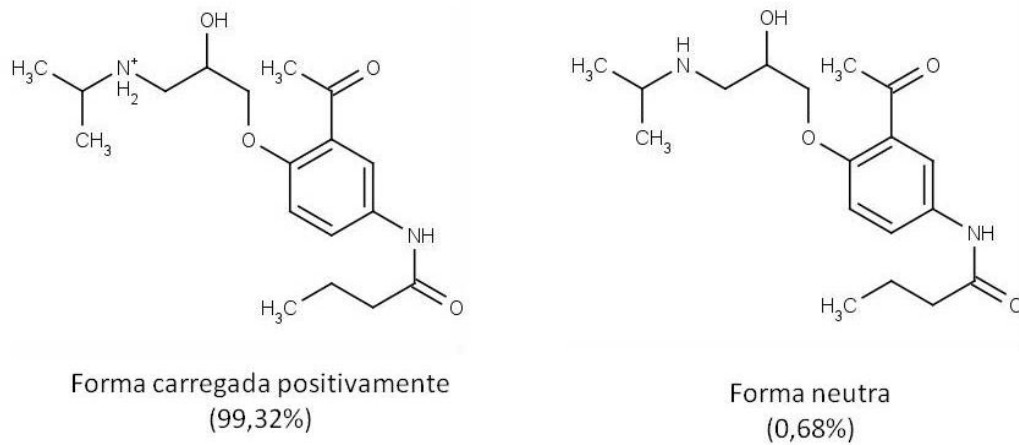


Figura 40 - Distribuição das microespécies de acebutolol a pH 7,4.

2.2.2 Verificação da lei de Lambert-Beer em UV-Vis e fluorescência

Partindo de soluções de acebutolol com concentrações crescentes, previamente preparadas por pesagem rigorosa e dissolução em tampão HEPES (pH 7,4; $I=0,1$ M), procedeu-se ao traçado dos respectivos espectros de absorvância UV-Vis, que apresentaram máximos de absorção a 320 nm (Figura 41):

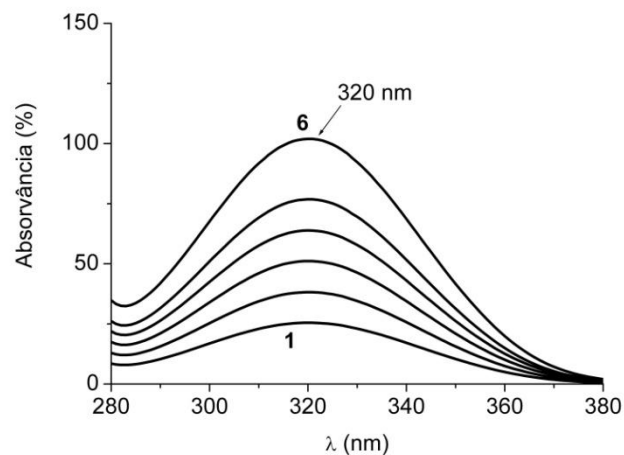


Figura 41 - Espectros de Absorção UV de padrões de acebutolol com concentrações (μM): 100 (1); 150 (2); 200 (3); 250 (4); 300 (5); 400 (6).

Para este máximo de absorção procedeu-se à verificação da lei de Lambert-Beer (Figura 42), concluindo-se que para $\lambda = 320$ nm a resposta é linear no intervalo de concentrações de 0 a 400 μM .

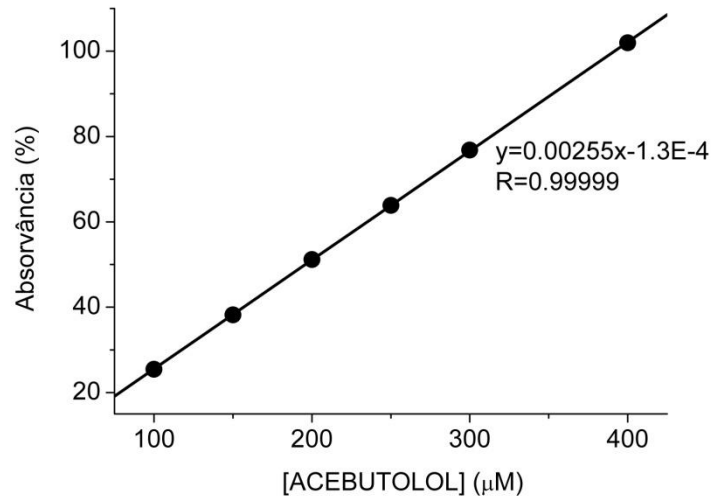


Figura 42 - Zona linear da lei de Lambert-Beer para o $\lambda_{\text{máx}}$ de 320 nm para padrões de acebutolol com concentrações (μM): 100 (1); 150 (2); 200 (3); 250 (4); 300 (5); 400 (6).

Também aqui, a determinação da zona linear da lei de Lambert-Beer foi importante para definir as concentrações de fármaco a utilizar nos ensaios posteriores, recorrendo-se sempre a uma concentração intermédia de forma a garantir que existe, em permanência, uma proporcionalidade entre absorvância e concentração.

Partindo de soluções de acebutolol com concentrações crescentes, previamente preparadas por pesagem rigorosa e dissolução em tampão HEPES (pH 7,4; $I=0,1$ M), procedeu-se ao traçado dos respectivos espectros de excitação e de emissão de fluorescência, que apresentaram máximos a 324 e 466 nm respectivamente (Figura 43):

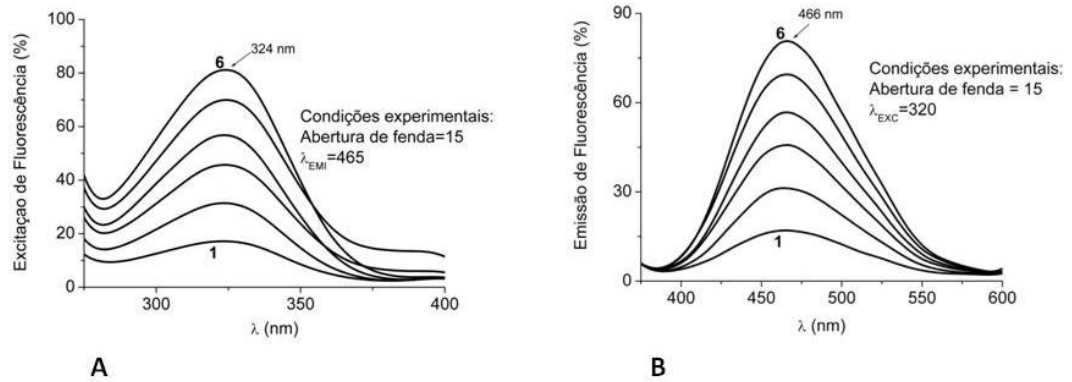


Figura 43 – Espectros de excitação (A) e emissão (B) de fluorescência de padrões de acebutolol com concentrações (μM): 10 (1); 20 (2); 30 (3); 40 (4); 50 (5); 60 (6).

Para o máximo de emissão de fluorescência procedeu-se à verificação da lei de Lambert-Beer (Figura 44), concluindo-se que para o $\lambda=466$ nm a resposta é linear no intervalo de concentrações de 0 a 60 μM .

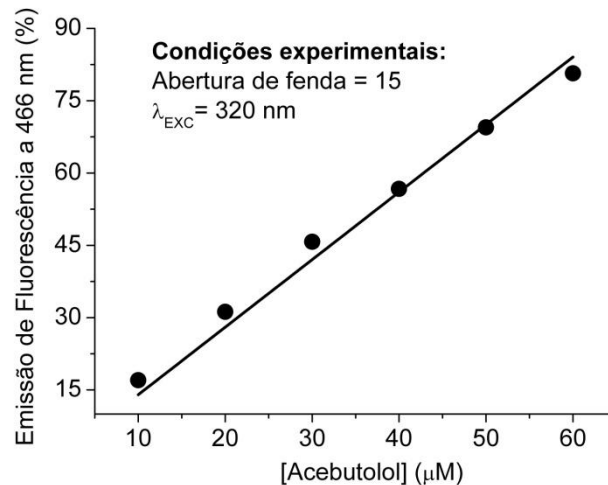


Figura 44 - Zona linear da lei de Lambert-Beer para o $\lambda_{m\acute{a}x}$ de 466 nm para padrões de acebutolol com concentrações (μM): 10 (1); 20 (2); 30 (3); 40 (4); 50 (5); 60 (6).

A determinação da zona linear da lei de Lambert-Beer foi importante para definir as concentrações de fármaco a usar nos ensaios posteriores, usando sempre uma concentração intermédia de forma a garantir que existe sempre uma proporcionalidade entre emissão de fluorescência e concentração.

3 Determinação do coeficiente de partição (K_p) nos sistemas lipossoma/água

3.1 Condições experimentais

Reagentes e aparelhos

Os fármacos estudados (acebutolol e propranolol), a fosfatidilcolina de gema de ovo (EPC) e o tampão HEPES hemisodium foram adquiridos à SIGMA Chemical CO. (St. Louis, MO, EUA).

As restantes substâncias foram adquiridas à MERCK (Darmstadt, Alemanha), com qualidade p.a. ou semelhante.

As soluções foram preparadas com água bi-desionizada (condutividade menor que $0,1 \mu\text{Scm}^{-1}$) e tampão HEPES (10 mM; pH 7,4; $I=0,1 \text{ M}$ com NaCl).

Para a determinação de pH foi utilizado um eléctrodo de vidro (Russel SWL), com eléctrodo de dupla junção AgCl/Ag como eléctrodo de referência. Para as determinações espectrofluorimétricas foi utilizado um espectrofluorímetro Perkin Elmer LS-50B, com células de quartzo, de 10 mm de percurso óptico, munido de um suporte para célula termostatizada.

Procedimento experimental

Os lipossomas foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico e processados por extrusão para obter lipossomas unilamelares (LUVs), segundo o processo já descrito. Para a determinação do K_p dos compostos cardiovasculares em estudo, foram utilizados dois grupos de eppendorfs de 2 mL, um para as amostras e outro para as referências.

Foram adicionadas, aos eppendorfs referentes às amostras, as soluções, de acordo com o seguinte procedimento:

- Um determinado volume de solução concentrada de fármaco, de forma a que a concentração final de fármaco em cada eppendorf seja sempre a mesma e esteja incluída na zona de linearidade da Lei de Beer;

- Volumes crescentes de solução concentrada de LUVs de EPC, de modo a que para a mesma concentração de fármaco existam concentrações crescentes de lípido;
- Tampão HEPES até perfazer os 2 mL.

Foi ainda utilizado um segundo grupo de eppendorfs de 2 mL contendo as referências, preparado em simultâneo com as amostras, e ao qual se adicionaram:

- Volumes crescentes de solução concentrada de LUVs de EPC, de modo a que as concentrações lipídicas igualem as das amostras;
- Tampão HEPES até perfazer os 2 mL.

As soluções preparadas foram seguidamente incubadas à temperatura ambiente durante 30 minutos. Em seguida, procedeu-se ao traçado dos espectros de emissão de fluorescência das soluções de amostras e referências num espectrofluorímetro.

Os espectros de emissão foram registados entre 350 a 600 nm e 300 a 800 nm, com uma abertura de fenda de 12 e 2,5 para o acebutolol e propranolol, respectivamente. Estes espectros foram traçados com intervalos de 0,5 nm, a uma velocidade de varrimento de 400 nmmin⁻¹. O comprimento de onda de excitação foi escolhido em função da absorção máxima dos fármacos, tendo sido seleccionado $\lambda_{m\acute{a}x} = 320$ e 286 nm para o acebutolol e propranolol, respectivamente.

As derivadas dos espectros foram calculadas a partir dos espectros de emissão de fluorescência, usando o algoritmo de Savitzky-Golay (140), o qual utiliza uma convolução polinomial de segunda ordem de treze pontos e um intervalo de comprimentos de onda de 0,5 nm (subrotinas providenciadas pelo “software” Microcal Origin 6,1™).

3.2 Resultados

O coeficiente de partição de um fármaco entre a fase lipídica e a aquosa pode ser determinado por espectrofluorimetria, desde que o fármaco seja um composto fluorescente e ocorram variações nas propriedades de fluorescência, de acordo com a distribuição do fármaco pela membrana e/ ou pela solução aquosa.

Além disso, a determinação do K_p por espectrofluorimetria apresenta algumas vantagens relativamente à determinação espectrofotométrica, nomeadamente, a redução da dispersão de luz causada pelas vesículas lipídicas que, no caso da espectrofluorimetria, é eficientemente eliminada com a determinação da 1ª derivada dos espectros. Uma outra

vantagem deste método reporta-se à sua sensibilidade, que é superior aos métodos espectrofotométricos, sendo assim possível a detecção de pequenas variações espectrais susceptíveis de ocorrerem como resultado da partição do fármaco no sistema lipossoma/água.

Pelos motivos apresentados, e aproveitando o facto de os fármacos estudados serem fluorescentes, efectuou-se a determinação do coeficiente de partição num sistema lipossoma/água por espectrofluorimetria e espectrofluorimetria derivativa.

3.2.1 Determinação do coeficiente de partição para o propranolol

Na Figura 45 é apresentado um exemplo ilustrativo da eficácia de eliminação da dispersão de luz pelo método de espectrofluorimetria e espectrofluorimetria derivativa:

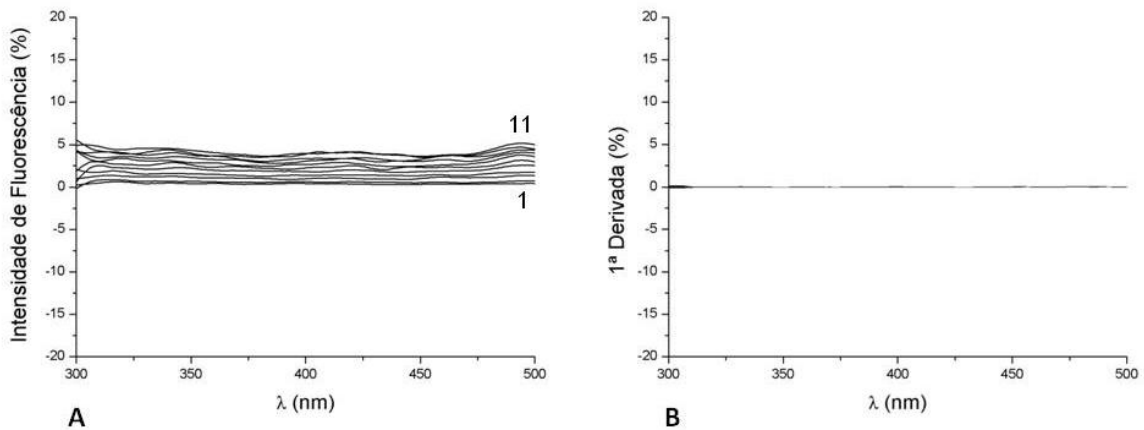


Figura 45 - Espectros de emissão de fluorescência (A) e espectros de 1ª Derivada (B) de suspensões de lipossomas LUVs de EPC em tampão HEPES (pH 7,4 e $I=0,1$), de concentrações (μM): 50 (1), 100 (2), 200 (3), 300 (4), 400 (5), 500 (6), 600 (7), 700 (8), 800 (9), 900 (10), 1000 (11).

Como é possível observar na Figura 45, a intensidade de luz dispersa correspondente aos LUVs de EPC até concentrações elevadas (A) é apenas de 5%, sendo este um valor que pode ser perfeitamente corrigido pela simples subtração da intensidade de emissão das referências à intensidade de emissão das amostras correspondentes. Adicionalmente, a aplicação da 1ª derivada (B) origina uma total eliminação da dispersão de luz, sem necessidade de qualquer correcção posterior.

De acordo com o observado, os espectros de emissão de fluorescência dos fármacos em estudo, na presença de LUVs de EPC, apresentam, igualmente, uma ligeira subida da linha de base à medida que a concentração de lípido aumenta (Figura 46 A, ponto II). Este efeito deve-se à já referida dispersão de luz causada pelas vesículas lipídicas, e poderia constituir um impedimento ao correcto doseamento do fármaco na fase lipossómica. No entanto, após a subtracção das intensidades de fluorescência obtidas para as referências, cuja concentração lipídica era semelhante à das amostras, conseguiu-se já uma eficiente correcção da luz dispersa (Figura 46 B, ponto II). Pode-se ainda observar, nos espectros de emissão do fármaco, a presença de um ponto isobéstico indicativo da existência de duas espécies, correspondentes ao fármaco distribuído pela fase membrana e ao fármaco distribuído pela fase aquosa (Figura 46 A, ponto I).

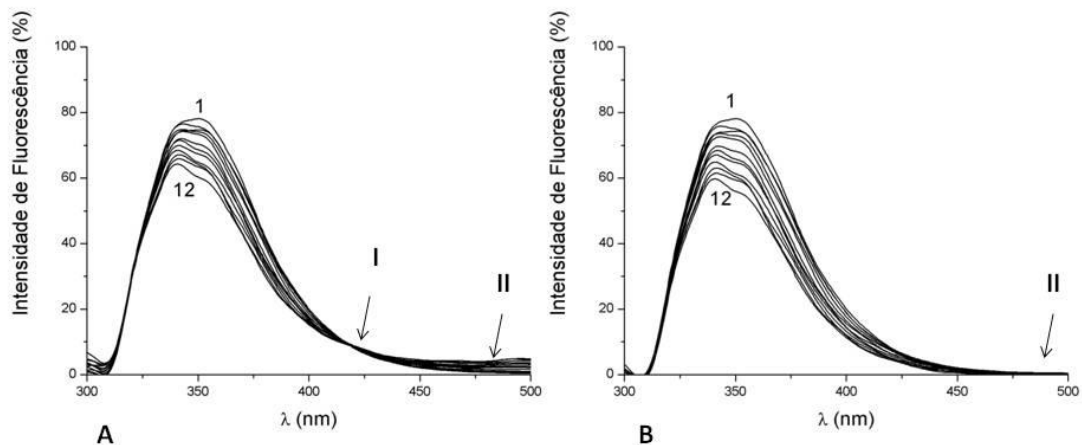


Figura 46 – Espectros de emissão de fluorescência (A) e respectivos espectros resultantes após a subtracção das referências (B) de amostras de propranolol (10,4 μM) preparadas em tampão HEPES (pH 7,4, $I = 0,1$) na presença de concentrações crescentes de LUVs de EPC (μM): 0 (1), 50 (2), 100 (3), 200 (4), 300 (5), 400 (6), 500 (7), 600 (8), 700 (9), 800 (10), 900 (11), 1000 (12). I representa um ponto isobéstico. II representa a linha de base correspondente à dispersão de luz que é eliminada em B, após a subtracção da contribuição relativa às referências.

Tal como foi mostrado na Figura 46, a interferência espectral provocada pela emissão da fase lipídica é pequena até concentrações elevadas de lípido e, uma vez que no presente estudo se procedeu a uma correcção de espectros das amostras, por subtracção das referências correspondentes, foi possível determinar o K_p LUVs/água do propranolol a partir do $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão (351 nm) sem recurso à derivação de espectros.

De igual forma se procedeu no caso dos espectros de excitação, em cujo $\lambda_{\text{máx}}$ (286 nm) foi possível determinar o K_p LUVs/água.

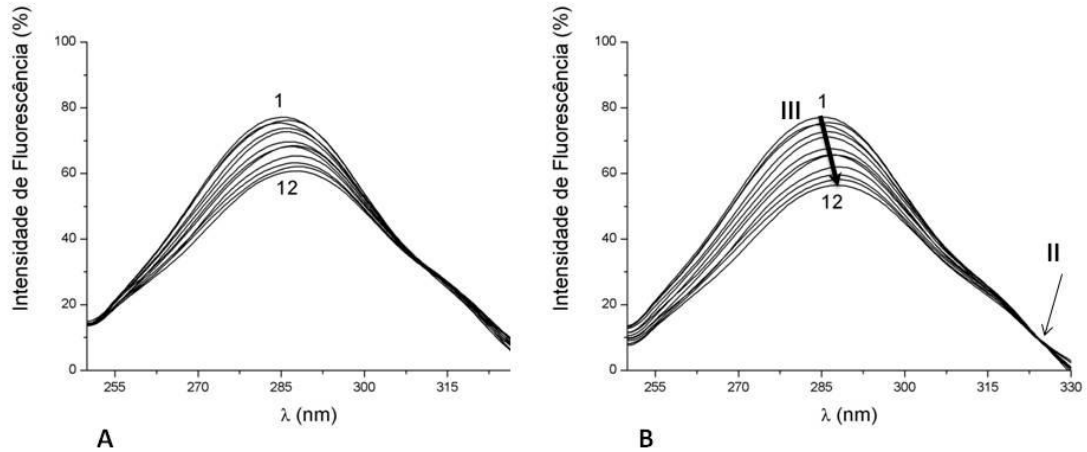


Figura 47 - Espectros de excitação de fluorescência (A) e respectivos espectros resultantes após a subtração das referências (B) de amostras de propranolol (10,4 μM) preparadas em tampão HEPES (pH 7,4, $I = 0,1$) na presença de concentrações crescentes de LUVs de EPC (μM): 0 (1), 50 (2), 100 (3), 200 (4), 300 (5), 400 (6), 500 (7), 600 (8), 700 (9), 800 (10), 900 (11), 1000 (12). II representa um ponto isobéptico. III representa o desvio batocrómico.

No espectro de excitação é possível verificar, mais uma vez, a existência de um ponto isobéptico (Figura 47 II-B), bem como o deslocamento do espectro para comprimentos de onda superiores (III-B), o que indica a presença do fármaco em pelo menos duas formas diferentes: uma forma livre, na fase aquosa polar, e uma forma ligada à membrana lipídica (103).

Tal desvio acontece porque, quando o fármaco se encontra distribuído pela fase aquosa e membrana, a polaridade do microambiente que o rodeia pode exercer profundos efeitos no seu espectro. Estas variações das características espectrais, de acordo com a distribuição do fármaco pela membrana e/ou pela solução aquosa, permitem determinar o coeficiente de partição através da Equação 9:

Assim, o valor de K_p LUVs/água do propranolol foi determinado a partir de uma regressão não linear (I_T vs $[L]$) obtida por ajuste da Equação 9 aos dados experimentais: intensidade

de fluorescência emitida e excitada ao $\lambda_{\text{máx}}$ obtidas para concentrações crescentes de LUVs de EPC ([L]).

Na Figura 48 apresentam-se exemplos de dois ajustes não lineares, obtidos para a emissão e excitação, a partir dos quais foi possível a determinação do valor de K_p do propranolol:

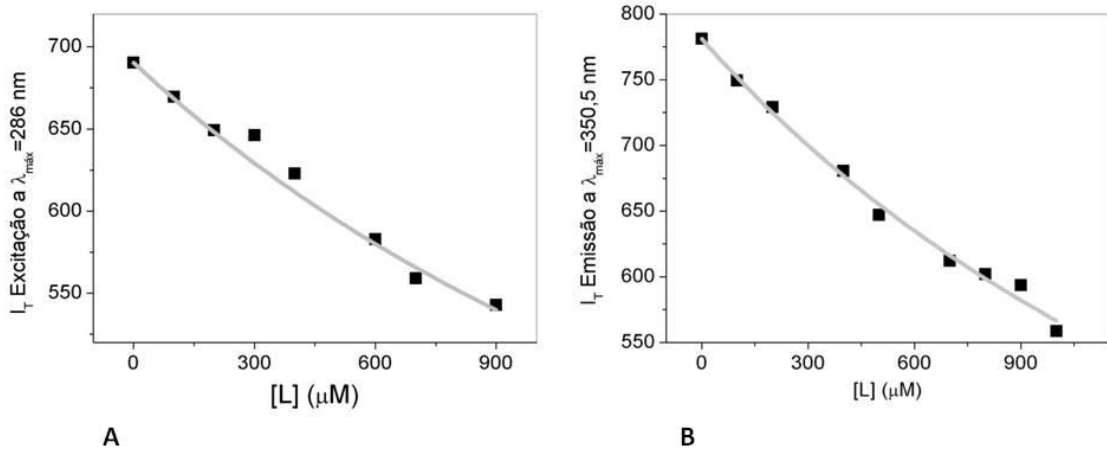


Figura 48 – Ajustes, pelo método de regressão não linear da Equação 9, aos dados experimentais de excitação (A) e emissão (B) corrigidos com a subtração das referências.

O valor de K_p obtido através da Equação 9 tem como unidades molL^{-1} . No entanto, para que os valores obtidos sejam adimensionais e, portanto, comparáveis com os $\log P$ octanol/água descritos na literatura, era necessário dividi-los pelo volume molar lipídico (V_ϕ) em Lmol^{-1} , que para a lecitina é descrito como $V_\phi = 0,688$ (55, 141).

O valor médio de K_p LUVs/água do propranolol obtido por regressão não linear para os $\lambda_{\text{máx}}$ dos espectros corrigidos e, para pelo menos 3 ensaios independentes foi, de 802 ± 220 .

3.2.2 Determinação do coeficiente de partição para o acebutolol

Tal como foi observado para o caso do propranolol, também a espectrofluorimetria derivativa se revelou muito eficaz na eliminação da dispersão de luz causada pelos modelos membranares utilizados (LUVs de EPC) na determinação do K_p do acebutolol. Na Figura 49 é apresentado um exemplo ilustrativo da eficácia da eliminação da dispersão de luz por aplicação das 1ª e 2ª derivadas aos respectivos espectros de fluorescência, correspondentes às suspensões de lipossomas.

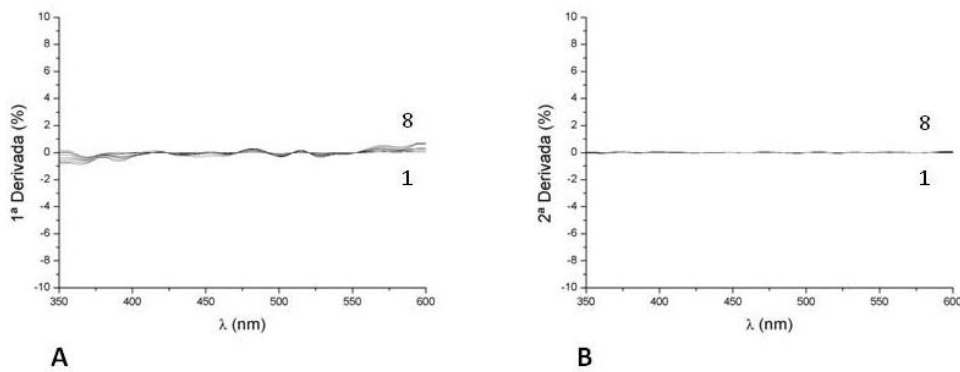


Figura 49 – Espectros de 1ª Derivada (A) e 2ª Derivada (B) de suspensões de lipossomas LUVs de EPC em tampão HEPES (pH 7,4 e $I=0,1$), de concentrações (μM): 50 (1); 100 (2); 200 (3); 300 (4); 400 (5); 500 (6); 700 (7); 900 (8).

De acordo com o exposto, procedeu-se à determinação do coeficiente de partição após a derivação dos espectros de fluorescência, quer correspondentes à excitação, quer correspondentes à emissão. Uma vez que a aplicação da 1ª derivada aos espectros origina, já, uma total eliminação da dispersão da luz, optou-se por não efectuar a determinação do K_p com derivadas superiores, uma vez que a razão sinal/ruído seria superior.

Na figura seguinte apresentam-se a 1ª derivada dos espectros de excitação e de emissão de fluorescência do acebutolol (após subtração das referências correspondentes).

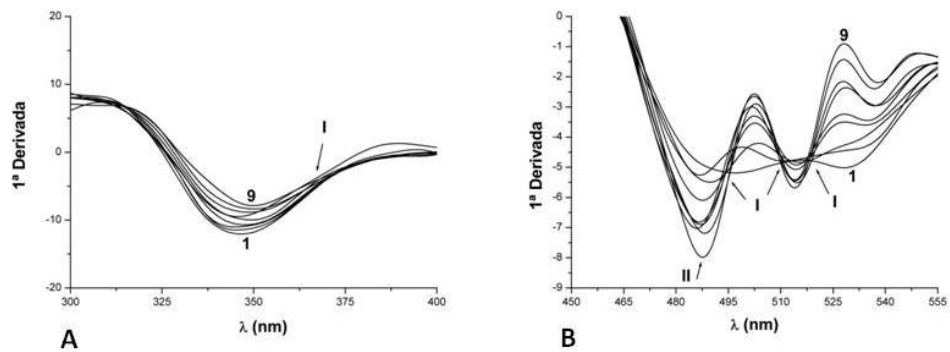


Figura 50 – 1ª Derivada dos espectros de excitação (A) e emissão (B) de fluorescência de amostras de acebutolol (40 μM) preparadas em tampão HEPES (pH 7,4; $I=0,1$) na presença de concentrações crescentes de LUVs de EPC (μM): 0 (1); 50 (2); 100 (3); 200 (4); 300 (5); 400 (6); 500 (7); 700 (8); 900 (9). I indica a existência de pontos isobésticos. II indica o mínimo ao qual se efectua a determinação do coeficiente de partição.

Na 1ª derivada dos espectros de excitação e de emissão do acebutolol (Figura 50) é possível verificar a existência de pontos isobésticos (I) que indicam a presença do fármaco em pelo menos duas formas diferentes: livre na fase aquosa e uma forma ligada à membrana lipídica (103).

Por espectrofluorimetria derivativa, o cálculo do K_p do acebutolol efectuou-se pelo ajuste da Equação 10 aos dados experimentais (D vs $[L]$), através de uma regressão não linear (Figura 51), em que o parâmetro ajustado é o K_p . Teoricamente, os valores de K_p podem ser calculados a partir dos valores de D (1ª derivada dos espectros) a qualquer comprimento de onda. No entanto, de modo a aumentar a razão sinal/ruído, os valores de D deverão ser obtidos para os valores dos $\lambda_{\text{máx}}$ ou λ_{min} das derivadas dos espectros (Figura 50 B-II), dado que, na vizinhança destes valores, pequenas incorrecções na reprodutibilidade dos comprimentos de onda não implicam grandes alterações dos valores de D .

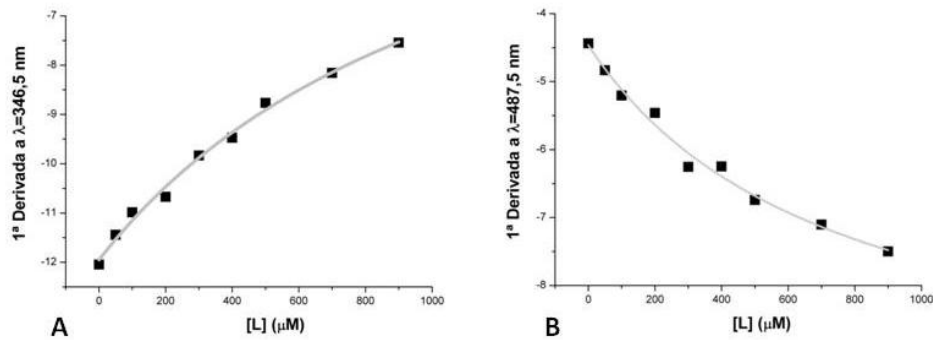


Figura 51 – Ajustes, pelo método de regressão não linear da Equação 10 aos dados experimentais da 1ª derivada de excitação (A) e emissão (B) corrigidos com a subtração das referências.

Tal como para o propranolol, o valor de K_p do acebutulol obtido através da Equação 10 tem como unidades molL^{-1} sendo necessário dividi-lo pelo volume molar lipídico (V_ϕ) em Lmol^{-1} , que para a lecitina é descrito como $V_\phi = 0,688$ (55, 141).

O valor médio de K_p LUVs/água do acebutulol obtido por regressão não linear para os $\lambda_{\text{máx}}$ dos espectros corrigidos e, para pelo menos 3 ensaios independentes foi então de 2424 ± 1110 .

3.3 Conclusões

No caso de fármacos que apresentam propriedades fluorescentes, a utilização da espectroscopia de fluorescência para a determinação do K_p no sistema lipossoma/água revelou ser um método mais adequado do que a espectrofotometria derivativa UV-Vis. De facto, as bandas de emissão de fluorescência apresentam menores efeitos de dispersão de luz. Estes efeitos são praticamente eliminados com a correcção dos espectros obtidos por subtração das referências correspondentes, ou pela determinação da 1ª derivada dos espectros.

O mesmo não seria possível pelos métodos de espectrofotometria UV-Vis, onde a forte interferência espectral da dispersão da luz obriga a processos de cálculo mais exigentes, com a correcção dos espectros por subtração das referências e determinação da 2ª e 3ª derivadas dos espectros.

3.3.1 Conclusões relativas à determinação do coeficiente de partição do propranolol

De acordo com o acima referido, e observando os resultados da Tabela 8, podemos verificar grandes diferenças relativamente aos valores de K_p consoante os sistemas utilizados na sua determinação.

Tabela 8 – Comparação dos valores de Partição do Propranolol. a) Valor calculado através de um programa Marvin sketch calculator da ChemaxonTM; b) Valor descrito na literatura (137).

Comparação Valores de Partição do Propranolol				
Sistema LUVs/água			Sistema octanol/água	
Valores determinados experimentalmente			Valor calculado teoricamente ^a	Valor descrito na literatura ^b
K_p (molL ⁻¹)	K_p (adimensional)	log D a pH 7,4	log D a pH 7,4	log P
552 ± 152	802 ± 220	2,90 ± 0,08	0,36	2,65

Os valores de K_p obtidos experimentalmente foram determinados a pH fisiológico (7,4). A este pH, o propranolol apresenta-se quase exclusivamente carregado positivamente, pelo que se prevê que as suas interações com a membrana sejam fundamentalmente do tipo electrostático. Assim, o valor de log D a pH 7,4, no sistema octanol/água, é muito inferior ao valor de log D determinado experimentalmente no sistema LUVs/água. Tal, deve-se ao facto do sistema octanol/água contabilizar apenas a quantidade de fármaco na forma neutra que partilharia no octanol.

Porém, há uma semelhança entre o log D (k_p determinado a pH 7,4) obtido experimentalmente e o log P (K_p determinado ao pH em que existe maioritariamente a forma neutra de fármaco) descrito na literatura, os quais apresentam a mesma ordem de grandeza, mas referem-se a tipos de partilha diferentes. No caso do log D a partilha é elevada, devido à ligação electrostática do fármaco à componente polar da bicamada lipídica. No caso do log P, o elevado coeficiente de partição a que corresponde deve-se às interações hidrofóbicas entre o fármaco na forma neutra e o ambiente apolar do octanol.

Assim, é possível concluir que um valor elevado do coeficiente de partição não é conseguido, exclusivamente, por fármacos que estejam na forma neutra ao pH de estudo.

Os lipossomas e, em particular, os LUVs, que apresentam uma única bicamada e um volume de solução aquosa razoavelmente grande no seu interior, têm um maior interesse nos estudos *in vitro* de interacção dos fármacos com as membranas biológicas, na medida em que as mimetizam de uma forma que poderá ser mais facilmente extrapolável para as condições *in vivo*.

3.3.2 Conclusões relativas à determinação do coeficiente de partição do acebutolol

De acordo com o já referido para o propranolol, e observando os resultados da Tabela 9, podemos igualmente verificar grandes diferenças relativamente aos valores de K_p do acebutolol consoante os sistemas utilizados na sua determinação.

Tabela 9 – Comparação dos valores de Partição do Acebutolol. a) Valor calculado através de um programa Marvin sketch calculator da ChemaxonTM; b) Valor descrito na literatura (142).

Comparação Valores de Partição do Acebutolol				
Sistema LUVs/água			Sistema octanol/água	
Valores determinados experimentalmente			Valor calculado teoricamente ^a	Valor descrito na literatura ^b
K_p (molL ⁻¹)	K_p (adimensional)	log D a pH 7,4	log D a pH 7,4	log P
1668 ± 763	2424 ± 1110	3,38 ± 0,21	-0,6	1,45

Os valores de K_p obtidos experimentalmente foram determinados a pH fisiológico (7,4). A este pH, o acebutolol apresenta-se, também, quase exclusivamente carregado positivamente, pelo que se prevê que as interacções electrostáticas apresentem uma forte participação no processo de partilha do fármaco ao nível da membrana. Assim, o valor de log D a pH 7,4, no sistema octanol/água, é muito inferior ao valor de log D determinado experimentalmente no sistema LUVs/água. Tal se deve ao facto do sistema octanol/água não contabilizar a quantidade de fármaco na forma carregada que se ligará, eventualmente, às cabeças polares da membrana.

Então, é possível concluir, mais uma vez, que um valor elevado do coeficiente de partição não é conseguido exclusivamente por fármacos que estejam na forma neutra, ao pH de

estudo. O acebutolol, estando maioritariamente na forma ionizada, é ainda capaz de interagir ao nível da zona interfacial da membrana, possuindo dessa forma um valor apreciável de partição, que num sistema bifásico octanol/água não seria contabilizado.

4 Avaliação da perturbação da microviscosidade, ordem e cooperatividade da membrana

4.1 Condições experimentais

Reagentes e aparelhos

Os fármacos estudados (acebutolol e propranolol) e o tampão HEPES hemisodium foram adquiridos à SIGMA Chemical CO. (St. Louis, MO, EUA). A 1,2-dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) foi adquirida à Avanti Polar Lipids (Alabama, EUA). As sondas DPH e TMA-DPH foram adquiridas à Molecular Probes.

As restantes substâncias foram adquiridas à MERCK (Darmstadt, Alemanha) com qualidade p.a. ou semelhante.

As soluções concentradas das sondas foram preparadas por dissolução de uma quantidade de sonda numa mistura de solventes (clorofórmio/metanol) na proporção 3:2, de modo a obter concentrações de sonda na suspensão lipídica final de 5 μM .

As restantes soluções foram preparadas com água bi-desionizada (condutividade menor que 0,1 μScm^{-1}) e tampão HEPES (10 mM; pH 7,4; $I=0,1$ M com NaCl).

Para a determinação de pH foi utilizado um eléctrodo de vidro (Russel SWL), com eléctrodo de dupla junção AgCl/Ag como eléctrodo de referência. Para as determinações espectrofluorimétricas foi utilizado um espectrofluorímetro Perkin Elmer LS-50B, com células de quartzo de 10 mm de percurso óptico munido de um suporte para célula termostalizada.

Procedimento Experimental

Foram preparados lipossomas unilamelares (LUVs) de DPPC marcados com as sondas TMA-DPH ou DPH, tal como foi descrito anteriormente.

Os estudos foram realizados a pH 7,4 em soluções lipídicas marcadas, de concentração 500 μM .

A incorporação dos fármacos nas soluções lipídicas marcadas foi efectuada de duas formas:

Procedimento de incubação

Neste caso, as amostras foram preparadas por adição de uma determinada quantidade de solução concentrada de fármaco, de forma a obter suspensões lipossómicas com a quantidade pretendida de composto a estudar ([propranolol] = 10 μM ; [acebutolol] = 50 μM).

Depois da preparação dos LUVs, e após agitação suave, as suspensões LUVs/fármaco foram incubadas durante 30 minutos acima da temperatura de transição de fase ($45 \pm 0,1$ $^{\circ}\text{C}$).

Procedimento de inclusão

Os compostos estudados (propranolol e acebutolol) foram adicionados directamente à fase clorofórmica durante a preparação dos lipossomas de forma a obter a concentração de fármaco mais elevada. Após a dissolução dos compostos, a preparação das amostras seguiu os mesmos passos descritos para a preparação de lipossomas unilamelares de DPPC marcados com as sondas.

Seguidamente, procedeu-se à determinação da anisotropia de estado estacionário a diferentes temperaturas, num intervalo de 25 a $60 \pm 0,1$ $^{\circ}\text{C}$, com uma sonda de temperatura. Os comprimentos de onda de excitação foram definidos como 360 nm e os de emissão como 440 nm para a TMA-DPH e 426 nm para a DPH.

A abertura da fenda foi ajustada de acordo com os ensaios realizados, variando entre 2,5 e 4 nm, e o tempo de integração utilizado foi de 10 segundos.

4.2 Resultados

Pretende-se, com o uso de duas sondas de fluorescência de localização bem caracterizada e distinta na membrana, analisar de que forma os fármacos cardiovasculares estudados interagem em diferentes zonas na membrana (uma mais

superficial ao nível das cabeças polares dos fosfolípidos e outra mais profunda ao nível das caudas hidrofóbicas), e como afectam as propriedades biofísicas dessas zonas membranares, tais como a transição de fase (T_m); a cooperatividade da transição de fase e a ordem membrana. Para isso, recorreu-se à utilização de fármaco incubado em concentrações mais reduzidas com a membrana lipídica, e também à utilização de concentrações mais extremas de fármaco, na tentativa de simular as consequências de concentrações superiores resultantes, por exemplo, de bioacumulação.

4.2.1 Resultados obtidos para o propranolol

A influência do propranolol nas propriedades biofísicas da membrana foi determinada através da representação gráfica dos valores de anisotropia em função da temperatura.

Na Figura 52 apresenta-se a representação das curvas sigmóides correspondentes à interacção do propranolol com LUVs marcados com a sonda DPH (A) e TMA-DPH (B).

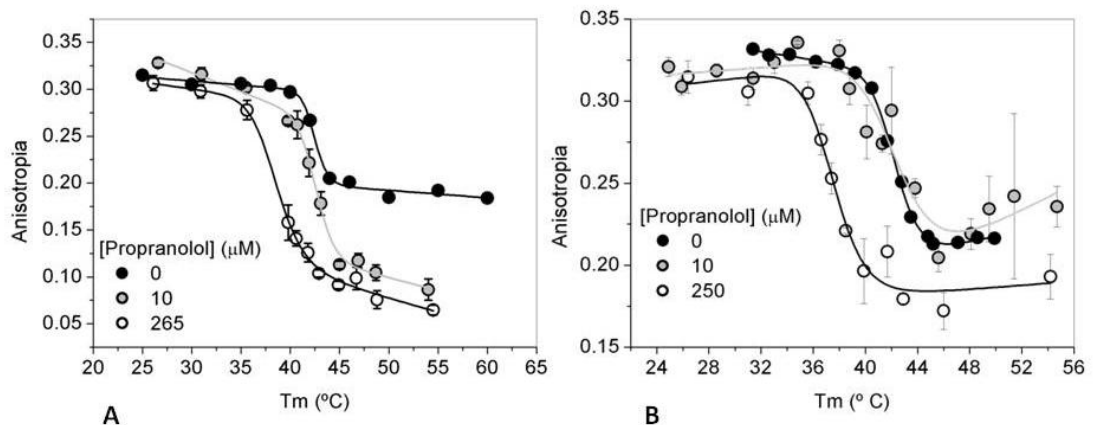


Figura 52 – Anisotropia de estado estacionário da sonda DPH (A) e TMA-DPH (B) na ausência (círculo a preto) e na presença de propranolol adicionado por incubação (círculo cinza) e por inclusão (círculo branco), medida em função da temperatura. Cada ponto corresponde a um valor médio \pm desvio padrão de pelo menos 3 ensaios e as linhas são o melhor ajuste obtido de acordo com a Equação 13.

Por análise da figura Figura 52 A é possível verificar que o efeito do propranolol nas propriedades biofísicas da membrana dá-se, principalmente, após a temperatura de transição de fase, ou seja, na fase fluida membrana. Comparativamente aos LUVs de DPPC na ausência de fármaco, os valores da anisotropia para os LUVs de DPPC na

presença de fármaco diminuíram, o que significa um efeito de fluidificação do propranolol dependente da concentração.

Em relação à Figura 52 B pode verificar-se que o efeito do propranolol para a concentração mais baixa testada corresponde a uma ligeira fluidificação na fase de gel, e a um ligeiro aumento da rigidez na fase fluida membranar. No entanto, o aumento da concentração de propranolol leva a um efeito de fluidificação nas duas fases, sendo que esse efeito é mais notório na fase fluida membranar.

Comparando os resultados obtidos para as duas sondas, verifica-se que, no caso dos LUVs marcados com DPH, o efeito de fluidificação do propranolol é visível mesmo para baixas concentrações. Em contrapartida, nos LUVs com TMA-DPH foi necessário atingir uma elevada concentração de fármaco para que os efeitos de fluidificação se tornassem evidentes. Tal, deve-se ao facto da sonda DPH reportar os efeitos do fármaco na zona das cadeias dos ácidos gordos da membrana, que é uma zona mais fluida e mais facilmente perturbada. Já a TMA-DPH reporta os efeitos do fármaco na zona das cabeças polares da membrana, que correspondem a uma zona designada por *plateau*, que apresenta uma maior rigidez e, como tal, maior resistência à perturbação.

A partir de cada um dos perfis sigmóides obtidos, para as diferentes concentrações de fármacos testadas, foram calculados os diversos parâmetros biofísicos que caracterizam o estado da membrana: T_m , B e S.

De forma a visualizar melhor o efeito do propranolol na temperatura de transição de fase membranar, apresenta-se na Figura 53 uma representação gráfica dos efeitos referidos em função do tipo de sonda e da concentração de fármaco.

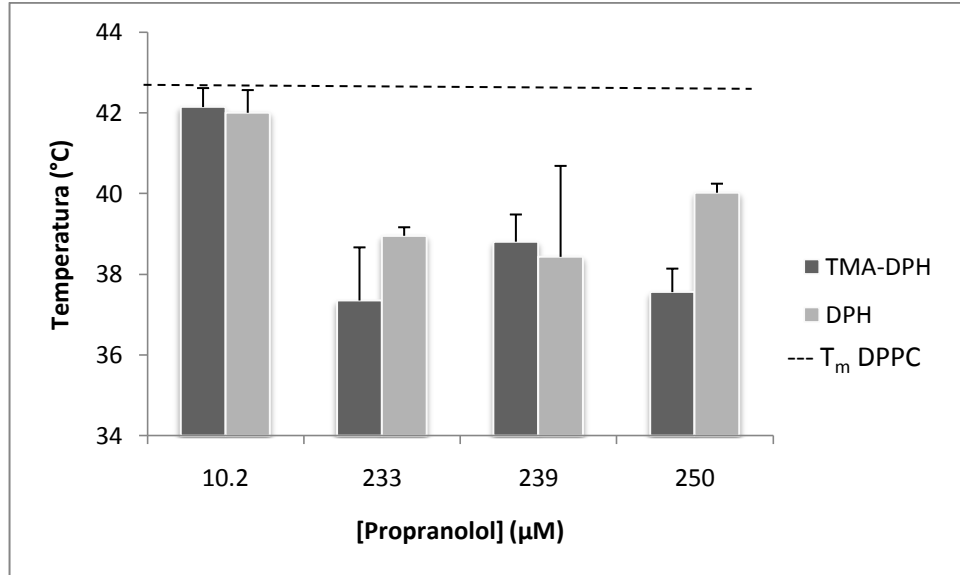


Figura 53 – Efeito do propranolol na temperatura de transição de fase dos LUVs de DPPC (linha a tracejado refere-se ao valor médio da T_m na ausência de fármaco) marcados com TMA-DPH (a cinza escuro) e DPH (a cinza claro).

Por análise da Figura 53 é possível verificar que o propranolol diminui a temperatura de transição de fase dos LUVs de DPPC marcados, quer com a sonda TMA-DPH, quer com a sonda DPH. Tal significa que o propranolol interage tanto com a zona polar mais superficial da membrana (reportada pela TMA-DPH), como com a zona apolar mais profunda (reportada pela DPH).

No entanto, pode analisar-se, também, que este efeito de diminuição da temperatura de transição de fase é mais significativo para os LUVs de DPPC marcados com a sonda TMA-DPH, o que indica uma localização preferencial do fármaco ao nível das cabeças polares dos fosfolípidos.

É ainda de salientar que o efeito de abaixamento da T_m dos LUVs de DPPC marcados com a sonda DPH é menor para as concentrações mais altas de propranolol testadas (ver Figura 53, barra cinza claro correspondente à maior concentração representada). Uma possível explicação para este facto poderá residir na repulsão electrostática existente entre as moléculas de fármaco carregadas positivamente, que poderão ser inclusivamente expulsas do ambiente membranar apolar para a fase aquosa, diminuindo a concentração efectiva de fármaco capaz de alterar a temperatura de transição de fase. Este mesmo efeito não se verifica para a porção de fármaco que interage com a membrana mais superficialmente, porque, neste caso, uma maior concentração de fármaco promove uma interacção electrostática mais forte com os grupos carregados da

superfície da membrana (ver Figura 53, barra cinza escuro correspondente à maior concentração representada).

Para uma análise mais clara dos resultados, os parâmetros T_m , B e S calculados encontram-se sumarizados na Tabela 10, onde se apresentam os seus valores médios correspondentes aos LUVs marcados na ausência do fármaco e na presença da menor e da maior concentração de fármaco obtidas, respectivamente, pelo método de incubação e inclusão.

Tabela 10 – Parâmetros biofísicos T_m , B e S calculados para LUVs de DPPC marcados com TMA-DPH e DPH, na ausência e na presença de concentrações crescentes de propranolol.

LUVs DPPC + DPH			
Concentração de propranolol μM	T_m	B (Cooperatividade)	S (Ordem)
0	42,47 \pm 0,21	1241 \pm 334	0,692
10	42,00 \pm 0,56	681 \pm 170	0,287
265	38,96 \pm 0,21	527 \pm 72	0,159
LUVs DPPC + TMA-DPH			
Concentração de propranolol μM	T_m	B (Cooperatividade)	S (Ordem)
0	42,22 \pm 0,14	878 \pm 88	0,692
10	42,15 \pm 0,47	1038 \pm 294	0,719
250	37,56 \pm 0,58	623 \pm 277	0,603

Considera-se que a transição da fase gel para a fase fluida membranar, T_m , é um processo cooperativo, quando ocorre praticamente em simultâneo em todos os pontos da membrana. No entanto, a presença de elementos estranhos à constituição lipídica da membrana (por exemplo fármacos) pode levar a uma diminuição da cooperatividade, devido à propagação lenta da transição de fase ao longo da membrana.

De acordo com o que acima foi referido, e ao analisarmos os resultados obtidos na Tabela 10 para os LUVs de DPPC marcados com DPH, é possível verificar uma diminuição da cooperatividade do fenómeno de transição de fase, dependente da concentração de propranolol.

No caso dos LUVs de DPPC marcados com TMA-DPH, e em concordância com o que havia sido dito relativamente ao efeito do fármaco na fase fluida, a cooperatividade sofre apenas uma diminuição para a concentração mais elevada de fármaco. Este facto é devido à TMA-DPH reportar para as zonas das cabeças polares da membrana que são, portanto, mais dificilmente perturbadas.

Por análise da Tabela 10 verifica-se que, no caso dos LUVs de DPPC marcados com DPH, a ordem membranar diminui com o aumento da concentração de propranolol, o que é coerente com o já referido efeito de fluidificação deste fármaco.

De igual modo ao anteriormente verificado para os LUVs de DPPC marcados com TMA-DPH, apenas para concentrações maiores de fármaco se verifica um efeito de diminuição da ordem membranar, pelo facto de a zona do *plateau* polar ser mais rígida e, portanto, mais ordenada.

4.2.2 Resultados obtidos para o acebutolol

A influência do acebutolol nas propriedades biofísicas da membrana foi determinada através da representação gráfica dos valores da anisotropia em função da temperatura. Na Figura 54 apresenta-se a representação das curvas sigmóides correspondentes à interacção do acebutolol com LUVs marcados com sonda DPH (A) e TMA-DPH (B).

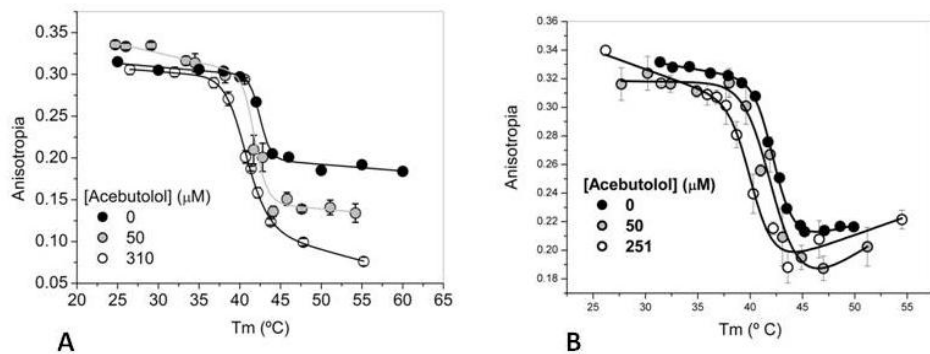


Figura 54 – Anisotropia de estado estacionário da sonda DPH (A) e TMA-DPH (B) na ausência (círculo a preto) e na presença de acebutolol adicionado por incubação (círculo cinza) e por inclusão (círculo branco), medida em função da temperatura. Cada ponto corresponde a um valor médio \pm desvio padrão de pelo menos 3 ensaios e as linhas são o melhor ajuste obtido de acordo com a equação Equação 13.

Por análise da Figura 54 A é possível verificar que o efeito do acebutolol nas propriedades biofísicas da membrana, marcada com a sonda DPH, é mais acentuado a temperaturas superiores à temperatura de transição de fase, ou seja, na fase fluida membrana. De facto, por comparação com os valores de anisotropia dos LUVs na ausência de fármaco, o aumento da concentração de acebutolol adicionado à membrana provoca uma notória diminuição dos valores de anisotropia, o que significa um efeito de fluidificação membrana dependente da concentração de acebutolol.

Em relação à Figura 54 B podemos verificar que o efeito do acebutolol, quer na fase gel, quer na fase fluida membrana, é reduzido. No entanto, verifica-se que, no intervalo correspondente à transição de fase, o efeito do acebutolol é mais marcado, com o desvio da anisotropia para valores inferiores que pode ser traduzido como uma alteração notória da temperatura de transição de fase.

A partir de cada uma das curvas sigmóides obtidas para as diferentes concentrações de acebutolol testadas, foram calculados os diversos parâmetros biofísicos que caracterizam o estado da membrana: T_m , B e S. Estes parâmetros encontram-se sumarizados na Tabela 11 que reúne os seus valores médios correspondentes aos LUVs marcados na ausência de fármaco e na presença da menor e maior concentração de fármaco obtidas, respectivamente, pelo método de incubação e inclusão.

Tabela 11 - Parâmetros biofísicos T_m , B e S calculados para LUVs de DPPC marcados com TMA-DPH e DPH na ausência e na presença de concentrações crescentes de acebutolol.

LUVs DPPC + DPH			
Concentração de acebutolol μM	T_m	B (Cooperatividade)	S (Ordem)
0	$42,47 \pm 0,21$	1241 ± 334	0,692
50	$41,80 \pm 0,11$	777 ± 201	0,386
310	$40,75 \pm 0,19$	536 ± 66	0,286
LUVs DPPC + TMA-DPH			
Concentração de acebutolol μM	T_m	B (Cooperatividade)	S (Ordem)
0	$42,22 \pm 0,14$	878 ± 88	0,692
50	$42,06 \pm 0,73$	644 ± 294	0,695
235	$39,73 \pm 0,55$	444 ± 112	0,649

Ao analisarmos os resultados obtidos na Tabela 11 para os LUVs de DPPC marcados, quer com a sonda DPH, quer com a sonda TMA-DPH, é possível verificar uma diminuição da cooperatividade do fenómeno de transição de fase dependente da concentração de acebutolol. Verifica-se, ainda, uma diminuição da ordem membranar com o aumento da concentração de fármaco, sendo este efeito mais visível no interior membranar (reportado pela sonda DPH). Esta observação está em concordância com o já referido efeito de fluidificação do acebutolol em LUVs marcados com DPH. Com respeito às camadas superficiais da membrana (reportadas pela TMA-DPH), verifica-se uma menor diminuição da ordem membranar pelo facto de esta ser uma zona mais dificilmente perturbável. No entanto, a presença do acebutolol ao nível das cabeças polares da membrana é notória, como se constata pela diminuição da cooperatividade do processo de transição de fase observado para a sonda TMA-DPH.

4.3 Conclusões

4.3.1 Conclusões relativas aos efeitos do propranolol na biofísica membranar

O propranolol revelou, de um modo geral, um efeito nas propriedades biofísicas membranares que pode ser resumido por:

- 1) uma diminuição da microviscosidade da membrana, comprovada pela diminuição da temperatura de transição de fase em cerca de 4 °C;
- 2) uma diminuição da cooperatividade da transição de fase membranar;
- 3) uma diminuição da ordem do empacotamento lipídico membranar.

Estes três efeitos fundamentais revelam um efeito geral de aumento notório da fluidez membranar por acção do propranolol.

A perturbação significativa da fluidez membranar pelo propranolol poderá estar relacionada com o seu efeito terapêutico. Assim, por um lado, os efeitos perturbadores na membrana explicam a capacidade do fármaco atravessar as diferentes barreiras lipídicas que encontra no seu trajecto, desde a fase de absorção no lúmen intestinal, que é essencialmente revestido por uma monocamada de lipídios semelhantes ao DPPC, até à fase farmacodinâmica, onde o fármaco tem de, igualmente, atravessar as biomembranas para se dirigir ao seu local de acção e produzir o efeito farmacológico pretendido.

Este método, para além de fornecer uma visão geral do efeito perturbador do propranolol ao nível membranar, permite ainda distinguir efeitos distintos, de acordo com a localização deste fármaco na membrana. Desta forma, comprova-se a já descrita existência de zonas membranares com fluidez distinta, que incluem o designado *plateau* correspondente às cabeças polares mais dificilmente afectadas pelo fármaco, e o *core* membranar, correspondente às caudas apolares dos ácidos gordos, que são mais fluidas e mais facilmente perturbadas.

4.3.2 Conclusões relativas aos efeitos do acebutolol na biofísica membranar

Os efeitos do acebutolol nas propriedades biofísicas membranares foram os seguintes:

- 1) Diminuição da microviscosidade membranar, mais notória ao nível da superfície polar, comprovada pelo decréscimo da temperatura de transição de fase em cerca de 2,5 °C;
- 2) Diminuição da cooperatividade da transição de fase membranar observada, quer na superfície polar, quer no interior da membrana;
- 3) Diminuição da ordem do empacotamento lipídico.

Estes três efeitos fundamentais indicam um aumento da fluidez membranar por acção do acebutolol. Pode-se ainda estabelecer uma correlação entre este efeito perturbador da membrana e os efeitos terapêuticos do fármaco. De facto, a actividade simpaticomimética intrínseca do acebutolol é descrita como relacionável com os maiores efeitos perturbadores na membrana, pelo que os resultados obtidos pelo método de determinação da anisotropia *in vitro* corroboram os já verificados efeitos *in vivo* deste fármaco.

Assim, comparativamente ao propranolol, o efeito do acebutolol na temperatura de transição de fase foi inferior (o propranolol provocou uma diminuição da T_m de cerca de 4 °C, enquanto que para o acebutolol essa diminuição é de cerca de 2,5 °C). Os efeitos, relativamente, às diferentes localizações na membrana foram, também, ligeiramente diferentes para os dois fármacos. Então, no caso do propranolol a zona das cabeças polares quase não sofreu alterações da cooperatividade da transição de fase, ao passo que o acebutolol induziu uma diminuição da cooperatividade superior, a este nível, o que é indicativo de uma presença efectiva do acebutolol ao nível das cabeças polares dos fosfolípidos da membrana.

5. Avaliação da ligação à membrana por estudos de fluorescência com sonda ANS

5.1 Condições experimentais

Reagentes e aparelhos

Os fármacos estudados (acebutolol e propranolol) e o tampão HEPES hemisodium foram adquiridos à SIGMA Chemical CO. (St. Louis, MO, EUA). A 1,2-dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) foi adquirida à Avanti Polar Lipids (Alabama, EUA). O ácido 1-anilinoftaleno-8-sulfónico (1,8-ANS) foi adquirido à Molecular Probes (Eugene, OR).

As restantes substâncias foram adquiridas à MERCK (Darmstadt, Alemanha) com qualidade p.a. ou semelhante.

Uma solução concentrada de ANS (solução stock de concentração 6 mM) foi preparada por dissolução em etanol e armazenada ao abrigo da luz para posteriores utilizações. Em cada ensaio procedeu-se à preparação de solução de trabalho de ANS (concentração 3 mM), por diluição em etanol da solução stock.

As restantes soluções foram preparadas com água bi-desionizada (condutividade menor que $0,1 \mu\text{Scm}^{-1}$) e tampão HEPES (10 mM; pH 7,4; $I=0,1 \text{ M}$ com NaCl).

Para a determinação de pH foi utilizado um eléctrodo de vidro (Russel SWL), com eléctrodo de dupla junção AgCl/Ag como eléctrodo de referência. Para as determinações espectrofluorimétricas foi utilizado um espectrofluorímetro Perkin Elmer LS-50B, com células de quartzo de 10 mm de percurso óptico, munido de um suporte para célula termostatizada.

Procedimento Experimental

Foram preparados lipossomas unilamelares (LUVs) de DPPC, tal como foi descrito anteriormente.

Os estudos foram realizados a pH 7,4 e consistiram na incubação de concentrações crescentes de fármaco (definidas de acordo com a zona linear da curva de calibração) com lipossomas (LUVs de DPPC com concentração 50 μM) a uma temperatura de 50°C, durante 60 minutos. Assim, para o propranolol foram testadas as concentrações (μM): 2,7; 5,4; 8,1 e 10,8. Para o acebutolol foram testadas concentrações mais elevadas (μM):

10; 20; 30; 40; 50; 60. Também foram realizados ensaios na ausência de fármaco, designados por branco.

Após a incubação, as amostras foram colocadas à temperatura ambiente e sujeitas a titulação com a solução de trabalho de ANS. Sob agitação contínua, mediu-se a emissão de fluorescência da sonda ANS adicionada aos lípidos a 480 nm, com comprimento de onda de excitação definido como 385 nm.

5.2 Resultados

Tal como foi dito anteriormente, o estudo da ligação da sonda ANS aos lipossomas na ausência e na presença de diferentes concentrações de fármaco teve os seguintes objectivos: (i) investigar se os fármacos cardiovasculares estudados apresentavam um mecanismo de competição para os mesmos locais de ligação da ANS; (ii) obter parâmetros de associação da sonda à bicamada lipídica e verificar como esses parâmetros eram alterados face à presença dos fármacos; e (iii) determinar as variações de potencial de superfície condicionadas pela presença de diferentes concentrações de fármaco.

5.2.1 Resultados obtidos para o propranolol

Através dos declives das zonas lineares dos perfis de adsorção da sonda ANS à membrana, na ausência e na presença de concentrações crescentes de propranolol, foi possível determinar os coeficientes de emissão cujos valores se encontram representados na tabela seguinte:

Tabela 12 – Valores dos Coeficientes de Emissão obtidos na ausência e na presença de concentrações crescentes de Propranolol.

Propranolol (μM)	Coeficiente de Emissão
0 (Branco)	21,16 \pm 0.35
2,7	4,97 \pm 0.26
5,4	4,88 \pm 0.55
8,1	3,67 \pm 0.40
10,8	4,05 \pm 1.18

Por observação da tabela verifica-se que, relativamente, ao branco, a presença de propranolol leva a uma apreciável redução do coeficiente de emissão, o que é revelador da existência de um mecanismo de competição entre o propranolol e a sonda ANS para os mesmos locais de ligação à membrana.

Na Figura 55 apresentam-se os resultados dos estudos de ligação da sonda ANS à bicamada lipídica na ausência e na presença de concentrações crescentes de propranolol, a partir dos quais se efectuou a determinação dos parâmetros de associação, através da aplicação da isotérmica de Freundlich (Equação 16).

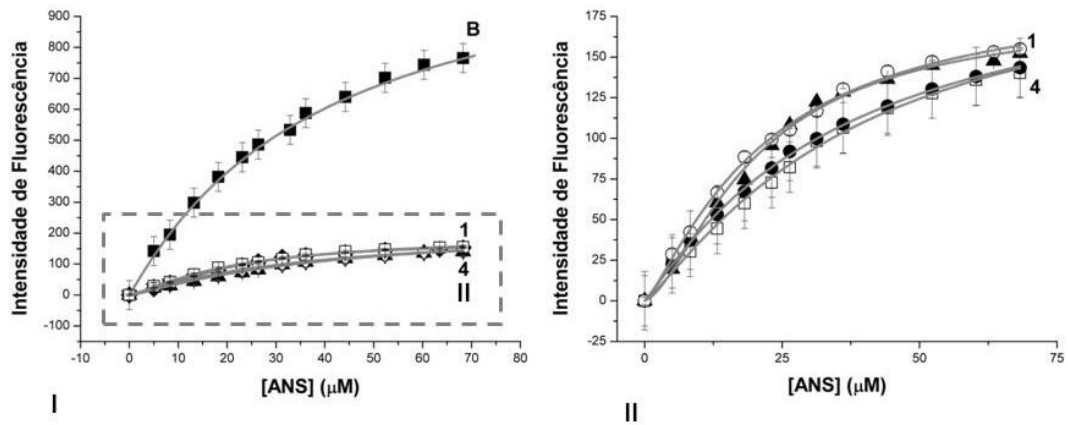


Figura 55 – Intensidade de fluorescência em função da concentração de ANS adsorvida a lipossomas de DPPC (50 μM) na ausência (B) e na presença de concentrações crescentes de propranolol (μM): 2,7 (1); 5,4 (2); 8,1 (3); 10,8 (4); 13,5 (5). Em (II) detalhe da zona a tracejado do gráfico (I). Os resultados apresentados correspondem à média \pm desvio padrão de 3 ensaios independentes e as linhas são o melhor ajuste obtido de acordo com a Equação 16.

A partir dos perfis de adsorção representados foi possível a determinação dos parâmetros de associação da sonda ANS à membrana, que se encontram reunidos na tabela seguinte:

Tabela 13 – Parâmetros de associação da sonda ANS à membrana (LUVs de DPPC) obtidos por ajuste dos dados experimentais na ausência e presença de concentrações crescentes de propranolol à Equação 16. $C_{m\acute{a}x}$ é a intensidade máxima de fluorescência (relacionada com a concentração máxima de sonda ligada à membrana); K é a constante de dissociação da sonda à membrana; e b é a cooperatividade do processo de ligação da sonda ANS à membrana. Os valores apresentados correspondem à média \pm desvio padrão de pelo menos 3 ensaios independentes.

[Propranolol] (μM)	$C_{m\acute{a}x}$	$K (10^{-2})$	b
0 (Branco)	1229 \pm 47	2,49 \pm 0,067	1,05 \pm 0,027
2,7	192 \pm 3	4,60 \pm 0,023	1,29 \pm 0,089
5,4	180 \pm 2	4,76 \pm 0,53	1,46 \pm 0,073
8,10	201 \pm 18	3,06 \pm 0,27	1,25 \pm 0,13
10,8	209 \pm 15	3,02 \pm 0,75	1,10 \pm 0,27

Por observação da tabela anterior, verifica-se que a concentração máxima de sonda ANS necessária para a ligação total à membrana diminuiu face à presença de propranolol. Tal se deve à existência de um mecanismo competitivo entre o fármaco e a sonda, para os mesmos locais de ligação. Assim, quando o propranolol está presente liga-se, preferencialmente, à membrana, diminuindo o número de locais de ligação disponíveis para a ligação da sonda ANS, que assim apresenta uma concentração máxima inferior.

O valor da constante de dissociação (K) da sonda ANS à membrana aumenta, significativamente, quando o fármaco está presente, comparativamente ao valor obtido na sua ausência. Este facto indica que na presença de propranolol ocorre uma maior dissociação da ANS da membrana e, conseqüentemente, uma menor ligação desta à membrana, devido à existência de fármaco que a ela se liga preferencialmente.

Em relação à cooperatividade do processo de ligação, b , esta não é significativamente alterada pela presença do fármaco, dado que o efeito do fármaco se reflecte mais no impedimento da ligação da sonda à superfície da membrana e menos na alteração da rapidez com que a sonda se liga à membrana. Assim a ligação da sonda à membrana diminui, porque o fármaco se liga preferencialmente à superfície dos fosfolípidos, mas a cooperatividade com que a sonda se liga não é afectada.

Para além dos parâmetros de associação, é ainda possível determinar as variações do potencial de superfície membranar, através da Equação 17, a partir dos valores apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 – Influência de concentrações crescentes de propranolol no potencial de superfície membranar, ψ (mV), calculado para a membrana lipídica (LUVs de DPPC) através da Equação 17. Os valores apresentados correspondem à média \pm desvio padrão de pelo menos 3 ensaios independentes.

[Propranolol] (μM)	Potencial de superfície membranar, ψ (mV)
2,7	-15,7 \pm 0,1
5,4	-16,6 \pm 2,7
8,10	-5,3 \pm 2,2
10,8	-4,9 \pm 5,1

Apesar dos valores obtidos para a variação do potencial de superfície não traduzirem numericamente a carga efectiva da membrana, uma vez que as razões DPPC/ANS são constantemente alteradas, a observação destes valores é extremamente útil sob o ponto de vista de comparação dos valores obtidos às várias concentrações de fármaco testadas.

Os valores apresentados correspondem a uma diminuição, em valor absoluto, do potencial membranar em função da concentração de propranolol. Esta diminuição deve-se à possível interacção electrostática entre o grupo amina catiónico do propranolol e o grupo fosfato aniónico do DPPC. Assim, a carga negativa do fosfato, presente na superfície membranar, vai sendo progressivamente neutralizada, enquanto que a carga positiva da colina se mantém efectiva, resultando numa carga superficial progressivamente mais positiva para concentrações de fármaco superiores.

5.2.2 Resultados obtidos para o acebutolol

Para avaliar a existência de um mecanismo de competição do acebutolol para os mesmos locais de ligação da ANS à membrana foram efectuadas as determinações dos coeficientes de emissão. Estes coeficientes foram calculados pelas zonas lineares dos perfis de adsorção da sonda à membrana na ausência e na presença de concentrações crescentes de acebutolol. Os valores dos coeficientes de emissão calculados encontram-se representados na tabela seguinte.

Tabela 15 - Valores dos coeficientes de emissão obtidos na ausência e na presença de concentrações crescentes de acebutolol. Os valores apresentados correspondem à média \pm desvio padrão de pelo menos 3 ensaios independentes.

[Acebutolol] (μM)	Coefficiente de Emissão
0 (Branco)	21,16 \pm 0,35
10	27,94 \pm 0,22
20	20,21 \pm 1,01
30	16,97 \pm 0,23
40	12,59 \pm 1,41
50	10,65 \pm 0,87
60	6,624 \pm 0,18

Por observação da Tabela 15 verifica-se que, à excepção das concentrações menores (10 e 20 μM), os coeficientes de emissão diminuíram com o aumento da concentração de acebutolol. Esta observação constitui uma indicação de que existe um mecanismo de competição entre o fármaco e a sonda para os mesmos locais de ligação na membrana. Para as concentrações menores referidas acima, os coeficientes de emissão obtidos foram da mesma ordem de grandeza do coeficiente de emissão obtido para o branco, o que significa que não existe fármaco em concentração suficiente para uma efectiva ligação à superfície membranar.

Uma vez que a sonda ANS possui um grupo sulfonato que estabelece ligação com as cabeças polares dos fosfolípidos (neste caso com as cargas positivas da colina), a ocorrência de competição do acebutolol é indicativa de que as moléculas deste fármaco se ligam à mesma região membranar.

Para além dos coeficientes de emissão, foram calculados os restantes parâmetros de associação da sonda ANS à membrana na ausência e na presença de concentrações crescentes de acebutolol. Na Figura 56 apresentam-se os perfis de adsorção, para os quais se efectuou a determinação dos parâmetros de associação, através da aplicação da isotérmica de Freundlich (Equação 16).

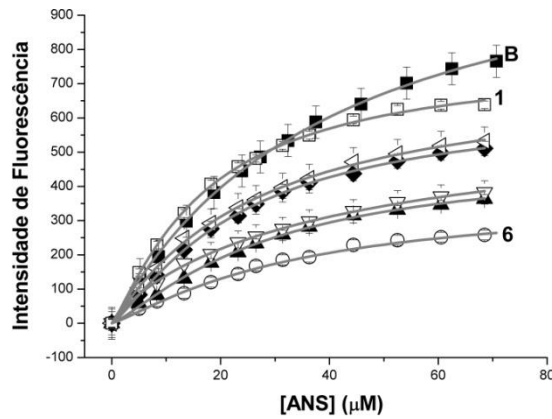


Figura 56 – Intensidade de fluorescência em função da concentração de ANS adsorvida a lipossomas de DPPC (50 μM) na ausência (B) e na presença de concentrações crescentes de acebutolol (μM): 10 (1); 20 (2); 30 (3); 40 (4); 50 (5); 60 (6). Os resultados apresentados correspondem à média \pm desvio padrão de 3 ensaios independentes e as linhas são o melhor ajuste obtido de acordo com a Equação 16.

Na Tabela 16 encontram-se reunidos os parâmetros de adsorção calculados a partir do ajuste efectuado, apresentado na Figura 56.

Tabela 16 - Parâmetros de associação da sonda ANS à membrana (LUVs de DPPC) obtidos por ajuste dos dados experimentais na ausência e presença de concentrações crescentes de acebutolol à Equação 16. $C_{\text{máx}}$ é a intensidade máxima de fluorescência (relacionada com a concentração máxima de sonda ligada à membrana); K é a constante de dissociação da sonda à membrana e b é a cooperatividade do processo de ligação da sonda ANS à membrana. Os valores apresentados correspondem à média \pm desvio padrão de pelo menos 3 ensaios independentes.

[Acebutolol] (μM)	$C_{\text{máx}}$	$K (10^{-2})$	b
0 (Branco)	1223 ± 47	$2,49 \pm 0,19$	$1,02 \pm 0,062$
10	765 ± 11	$6,14 \pm 0,29$	$1,24 \pm 0,054$
20	774 ± 42	$3,73 \pm 0,42$	$1,03 \pm 0,093$
30	673 ± 21	$4,07 \pm 0,20$	$1,15 \pm 0,084$
40	619 ± 34	$2,98 \pm 0,93$	$0,95 \pm 0,19$
50	499 ± 13	$3,53 \pm 0,087$	$1,18 \pm 0,10$
60	363 ± 15	$3,13 \pm 0,40$	$1,20 \pm 0,047$

Por observação da tabela anterior verifica-se que a concentração máxima de sonda ANS necessária para a ligação total à membrana diminuiu proporcionalmente à concentração de acebutolol. Esta diminuição constitui mais uma evidência da existência de um mecanismo competitivo entre o fármaco e a sonda para os mesmos locais de ligação. Assim, para concentrações elevadas de fármaco, este liga-se preferencialmente à membrana, diminuindo o número de locais de ligação disponíveis para a ligação da sonda ANS que, assim, apresenta uma concentração máxima inferior.

O valor da constante de dissociação (K) da sonda ANS à membrana aumenta significativamente quando o fármaco está presente, comparativamente com o valor obtido na sua ausência. Este facto mostra que na presença de acebutolol ocorre uma maior dissociação da ANS da membrana e, conseqüentemente, uma menor ligação desta à membrana, devido à existência de fármaco que a ela se liga preferencialmente.

Em relação à cooperatividade do processo de ligação, b, esta não é significativamente alterada pela presença do fármaco, dado que o fármaco impede, essencialmente, a ligação da sonda à membrana, mas não vai influenciar significativamente a rapidez com o processo de ligação se dá.

Para além dos parâmetros de associação, é ainda possível determinar as variações dos valores do potencial de superfície membranar através da Equação 17 apresentados na Tabela 17.

Tabela 17 - Influência de concentrações crescentes de acebutolol no potencial de superfície membranar, ψ (mV), calculado para a membrana lipídica (LUVs de DPPC) através da Equação 17. Os valores apresentados correspondem à média \pm desvio padrão de pelo menos 3 ensaios independentes.

[Acebutolol] (μM)	Potencial de superfície membranar, ψ (mV)
10	$-23,2 \pm 1,21$
20	$-10,4 \pm 0,682$
30	$-12,6 \pm 1,30$
40	$-4,62 \pm 4,54$
50	$-8,94 \pm 0,618$
60	$-5,87 \pm 3,22$

De acordo com os resultados apresentados, é possível verificar que existe uma diminuição em valor absoluto do potencial membranar com o aumento da concentração de acebutolol. É possível que, tal como sucedia com o propranolol, o grupo amina catiónico do acebutolol seja atraído pelo grupo fosfato aniónico do DPPC. Assim, a carga negativa do fosfato presente na superfície membranar vai sendo progressivamente neutralizada, enquanto que a carga positiva da colina se mantém efectiva, resultando numa carga superficial progressivamente mais positiva para concentrações de fármaco superiores.

5.3 Conclusões

5.3.1 Conclusões para o acebutolol e o propranolol

De acordo com os resultados obtidos pela técnica de ligação à membrana por estudos de fluorescência com a sonda ANS é possível concluir que o potencial de superfície membranar modulará provavelmente a interacção do acebutolol e propranolol com a membrana.

De facto, ao pH fisiológico reproduzido nos estudos *in vitro* realizados tanto o propranolol como o acebutolol se encontram carregados positivamente promovendo uma ligação electrostática ao grupo fosfato negativo das cabeças polares da membrana.

Este facto foi comprovado não só pela variação da carga superficial da membrana, mas também pela alteração dos parâmetros de associação da sonda ANS à membrana. Estes parâmetros revelaram uma progressiva diminuição da ligação da sonda com o aumento da concentração dos fármacos em virtude de um mecanismo de competição do fármaco com a sonda para os mesmos locais de ligação à membrana.

No entanto, se fizermos uma análise comparativa dos resultados obtidos para os dois compostos estudados, verificamos que enquanto para o acebutolol os efeitos observáveis são proporcionais à concentração, sendo necessárias concentrações maiores para verificar uma ligação à superfície membranar, no caso do propranolol o efeito de ligação à membrana é muito mais intenso e imediato, requerendo concentrações inferiores (concentrações menores que 10 μM). Tal pode ser indicativo de que a ligação electrostática à superfície membranar apresenta no caso do propranolol uma influência ainda mais significativa na ligação deste composto à membrana.

6. Avaliação do efeito no tamanho e na carga membranar por determinação do potencial zeta por dispersão de luz dinâmica

6.1 Condições experimentais

Reagentes e aparelhos

Os fármacos estudados (propranolol e acebutolol), a fosfatidilcolina de gema de ovo (EPC) e o tampão HEPES hemisodium foram adquiridos à SIGMA Chemical CO. (St. Louis, MO, EUA).

As soluções foram preparadas com água bi-desionizada (condutividade menor que $0,1 \mu\text{Scm}^{-1}$) e tampão HEPES (10 mM; pH 7,4).

Para a determinação de pH foi utilizado um eléctrodo de vidro (Russel SWL), com eléctrodo de dupla junção AgCl/Ag como eléctrodo de referência.

As determinações do tamanho dos lipossomas e do potencial zeta foram realizadas utilizando um aparelho de dispersão de laser, Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK).

Procedimento experimental

Os lipossomas foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico e processados por extrusão para obter lipossomas unilamelares (LUVs) segundo o processo já descrito. Foram preparadas suspensões lipossômicas de LUVs de concentração $100 \mu\text{M}$ às quais foram adicionadas concentrações crescentes de fármaco:

- Propranolol – 0; 18; 36; 45; 89; 178; 268; $312 \mu\text{M}$;

- Acebutolol – 0; 9; 17; 34; 43; 51; 64; 86; 129; 172; 257; 343; $515 \mu\text{M}$.

Seguidamente, a distribuição do tamanho das vesículas lipídicas foi determinada pela técnica de dispersão de luz dinâmica (DLS), com um ângulo de determinação de 173° . Para cada amostra, o diâmetro médio \pm o desvio padrão foram calculados para, pelo menos três determinações em dois ensaios independentes, aplicando a análise multimodal.

Foi possível, para as mesmas amostras, a determinação do potencial zeta. Para isso, procedeu-se ao enchimento de cuvetes de poliestireno com eléctrodos de platina, às quais foi aplicada um campo eléctrico. Os resultados de potencial zeta foram obtidos como o valor médio \pm desvio padrão para pelo menos três determinações, em dois ensaios independentes.

6.2 Resultados

Na figura Figura 57 pode observar-se a variação dos valores de tamanho e potencial zeta das amostras de LUVs de EPC, na ausência e na presença de concentrações crescentes dos fármacos estudados.

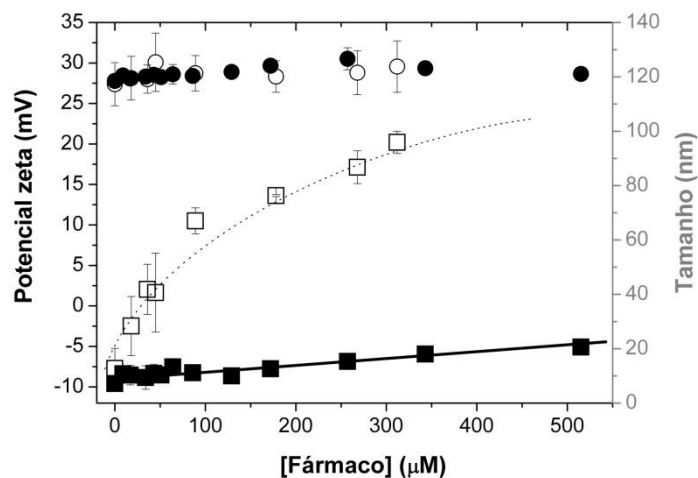


Figura 57 – Valores do potencial zeta (quadrados) e do tamanho (círculos) de vesículas de LUVs de EPC para concentrações crescentes de propranolol (símbolos a branco) (μM): 0; 18; 36; 45; 89; 178; 268; 312; e de acebutolol (símbolos a preto) (μM): 0; 9; 17; 34; 43; 51; 64; 86; 129; 172; 257; 343; 515. Os valores apresentados correspondem ao valor médio \pm desvio padrão para, pelo menos, 3 determinações, em dois ensaios independentes.

No que diz respeito à avaliação do tamanho das vesículas de fosfolípidos, verifica-se que a adição de concentrações crescentes de qualquer um dos fármacos cardiovasculares estudados, não provocou alterações significativas. Esta conclusão indica, por um lado, que a interacção dos fármacos cardiovasculares com a membrana lipídica não provoca grandes perturbações na sua morfologia. Por outro lado, a observação dos resultados obtidos para o branco (lipossomas sem fármaco) é a garantia de que os modelos membranares utilizados apresentavam a estabilidade requerida (119 ± 6 nm). É de

realçar que, apesar dos lipossomas terem sido produzidos a partir da extrusão por filtros de 100 nm, o valor de tamanho obtido é o que normalmente se encontra em lipossomas preparados em tampão, uma vez que, a medida do tamanho avalia o raio hidrodinâmico, correspondente ao raio da partícula mais as moléculas de solvatação.

Em relação às determinações do potencial zeta verifica-se um comportamento distinto para os dois fármacos estudados. Quanto ao propranolol, ocorre uma evolução do potencial membranar no sentido de valores progressivamente mais positivos com o aumento da concentração de fármaco. Tal ocorre, provavelmente, porque este fármaco apresenta-se carregado positivamente ao pH do estudo, ligando-se electrostaticamente aos grupos aniónicos correspondentes ao grupo fosfato dos fosfolípidos. Assim, a membrana fosfolipídica, que inicialmente apresentava um carácter aproximadamente neutro, vai ficando, progressivamente, carregada de forma positiva, devido aos grupos amina catiónicos da colina que deixam de ser neutralizados pela acção dos grupos fosfato.

Embora o acebutolol se encontre, igualmente, carregado positivamente, a sua influência sobre o potencial membranar é muito menos eficiente que a do propranolol. Tal poderá ser justificado pela ligação do acebutolol à superfície membranar não ser exclusivamente de origem electrostática, mas devido ao facto de existir alguma penetração molecular do fármaco ao nível das cabeças polares.

A determinação do potencial zeta, a par da determinação do tamanho dos lipossomas já mencionada, constitui uma medida da estabilidade do modelo membranar utilizado. Neste caso, os valores obtidos para o branco (LUVs sem fármaco) apresentam valores coerentes para uma carga superficial próxima da que é referida para membranas zwiteriónicas ($-7,99 \pm 1,90$ mV).

6.3 Conclusões

Dada a relevância biológica das propriedades da superfície da membrana lipídica, nomeadamente, das suas propriedades electrostáticas (evidenciadas em estudos de condução de estímulos eléctricos, funcionamento de enzimas e integridade estrutural da membrana), é necessário verificar como essas propriedades são influenciadas pela ligação dos fármacos à membrana. Assim, o conhecimento do potencial zeta pode ser utilizado para inferir sobre as cargas junto à interface membranar, fornecendo informações úteis à compreensão da partilha e localização dos fármacos na membrana.

Nos estudos realizados neste trabalho observou-se que fármacos do mesmo grupo terapêutico apresentam comportamento diferente face à superfície membranar. Assim, o propranolol revelou uma ligação à bicamada lipídica de natureza, quase exclusivamente, electrostática com grande alteração do potencial de superfície membranar. Por sua vez, o acebutolol apresenta alterações do potencial zeta inferiores às do propranolol, indicando que a sua ligação à membrana não é exclusivamente electrostática, ocorrendo possivelmente uma maior partilha a nível das cabeças polares, também justificada pelo facto de a molécula ser menos volumosa e, portanto, possuir um menor impedimento estérico à penetração membranar.

7. Previsão da localização preferencial dos fármacos ao nível da membrana por integração dos dados obtidos pelas diferentes técnicas

Os resultados obtidos pelas diferentes técnicas poderão ser correlacionados com a previsão da localização membranar dos fármacos.

Relativamente ao **propranolol**, a sua localização tem sido descrita como correlacionável com interacções hidrofóbicas em que os anéis naftalénicos do fármaco seriam responsáveis pela interacção com a zona hidrocarbonada da membrana (143, 144). No entanto, estes estudos negligenciavam o efeito da carga do fármaco ao nível membranar e faziam a determinação da partição do propranolol quando este se encontrava na sua forma neutra, ou seja a pH superior a 9. Este valor de pH não tem, no entanto, grande interesse fisiológico, e a pH 7.4 correspondente ao pH do soro, o fármaco encontra-se carregado positivamente. Em virtude disso, os ensaios realizados ao pH fisiológico revelaram que o propranolol, mesmo em concentrações reduzidas, tem uma grande influência ao nível da carga superficial da membrana, provavelmente ditada por uma atracção electrostática entre o grupo amina catiónico e o grupo fosfato dos fosfolípidos da membrana.

Para concentrações mais elevadas, o propranolol é capaz de provocar uma fluidificação ao nível das caudas hidrofóbicas da membrana, tal como conseguimos observar para os estudos realizados com a sonda DPH, revelando uma localização mais profunda do fármaco na bicamada lipídica. Resultados concordantes em relação ao efeito de fluidificação membranar foram apontados por outros autores, utilizando a técnica de calorimetria diferencial de varrimento (68, 145).

Relativamente ao **acebutolol**, os resultados do presente estudo confirmaram que a partição definida na literatura não prevê a interacção lipídica deste fármaco. De facto, o comportamento da partição de compostos não neutros ao pH dos estudos é determinado pela sua lipofilia, equilíbrio ácido-base, potencial para promover ligações de hidrogénio e sensibilidade conformacional em relação à polaridade da bicamada lipídica (1). Assim, os estudos realizados no âmbito deste trabalho revelaram que o acebutolol apresenta uma partição mais elevada na bicamada lipídica do que seria de esperar pelas determinações efectuadas em sistemas octanol/água e, inclusivamente, mais elevada do que a obtida para o propranolol. Para além disso, os estudos de concentrações mais elevadas de acebutolol com membranas marcadas, quer com a sonda TMA-DPH, quer com a sonda DPH, revelaram um efeito de aumento da fluidez membranar associado a perturbações ao nível da cooperatividade e ordem lipídica. Paralelamente, os estudos de potencial zeta e de influência na ligação da sonda ANS à superfície membranar revelaram que este fármaco tem uma influência menor que o propranolol na alteração da carga de superfície da membrana. Tal pode estar relacionado com a localização preferencial deste composto a um nível membranar mais profundo, o que justifica correctamente todas as observações realizadas neste trabalho, incluindo a sua maior partição. Esta proposta de localização do acebutolol ao nível membranar está em concordância com outros estudos realizados por outros autores, que chegaram à mesma conclusão, utilizando técnicas distintas tais como a desactivação de fluorescência, calorimetria diferencial de varrimento e estudos de raios x de baixo ângulo, o que constitui mais uma validação à proposta aqui formulada (146).

De forma a sintetizar os resultados obtidos pelas diferentes técnicas utilizadas, a Figura 58, que a seguir se apresenta, constitui um resumo da proposta de localização membranar dos fármacos estudados.

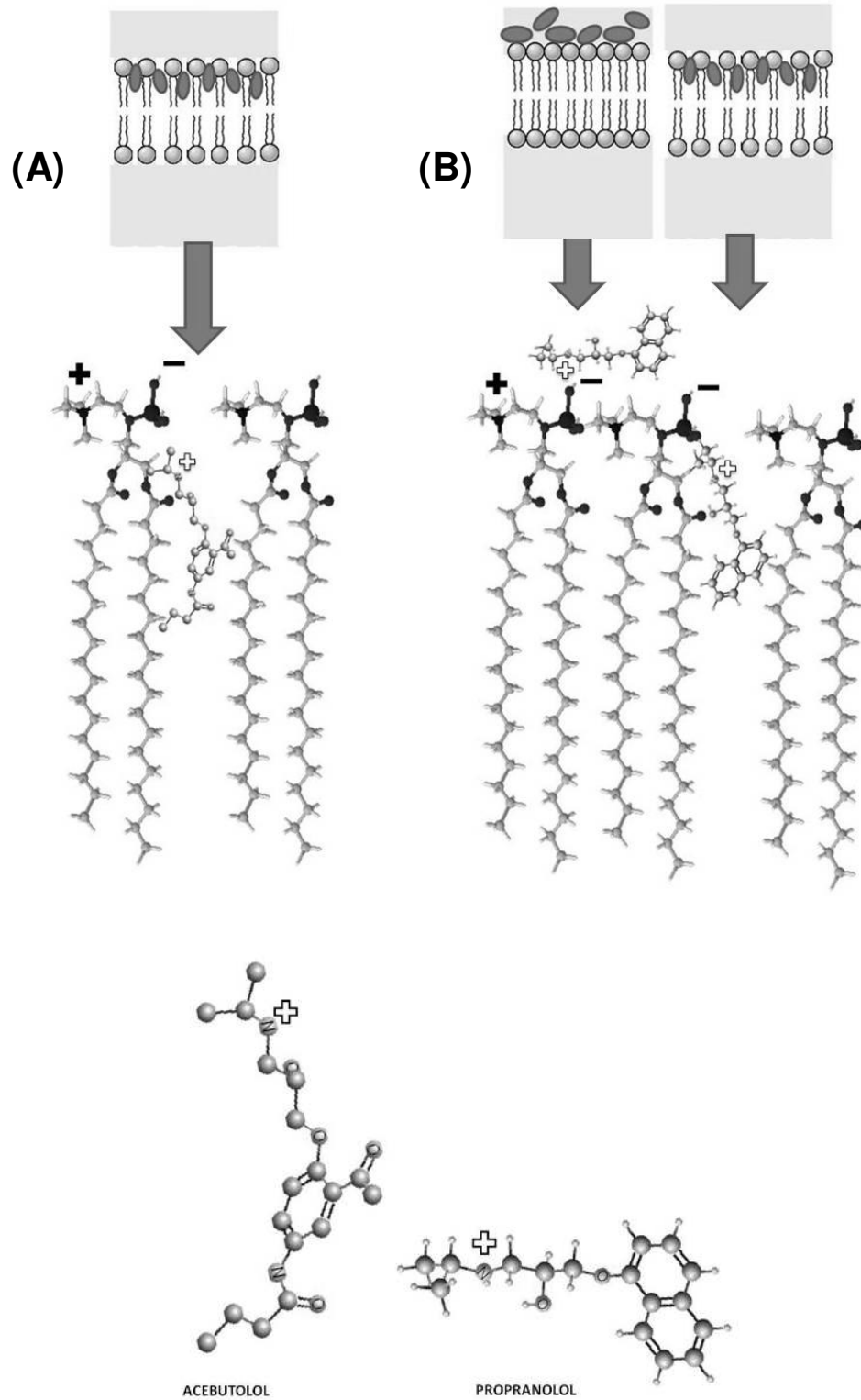


Figura 58 – Representação esquemática da proposta de localização membranar do acebutolol (A) e propranolol (B).

V. Conclusões e perspectivas futuras

Após compilação das diversas informações, obtidas no decurso deste trabalho, importa entender de que forma os β -bloqueadores estudados interagem com a membrana e quais as consequências dessa interacção.

Assim, como **conclusões gerais** desta dissertação tem-se que:

- Os estudos realizados permitem concluir que ambos os fármacos apresentam uma importante interacção com a membrana lipídica. Esta conclusão é suportada pelos dados obtidos para o coeficiente de partição (que indicam que os fármacos partilham com os lípidos membranares) e para os efeitos destes fármacos na biofísica membranares (que mostram que ocorre fluidificação da membrana lipídica). Também os efeitos dos fármacos na carga de superfície membranares foram avaliados, demonstrando uma capacidade de alteração do potencial de superfície.

- Os efeitos da interacção com a membrana correlacionam-se com os efeitos farmacológicos do propranolol e acebutolol. Sabe-se que, para que os fármacos exerçam os seus efeitos, é necessário que atravessem as membranas biológicas, de modo a chegarem ao seu local activo. Sabe-se, também, que estes fármacos são bem absorvidos após administração oral. Assim, e uma vez que a absorção é um processo que implica a difusão passiva pelas membranas do epitélio intestinal, a elevada interacção com a componente lipídica da membrana demonstrada por estes compostos apresenta-se como uma correlação evidente entre os estudos *in vitro* e a acção *in vivo*.

Os receptores β são receptores membranares, logo, os antagonistas ou agonistas parciais destes receptores (caso dos fármacos cardiovasculares estudados) necessitam de uma estrutura química que permita a sua interacção com a membrana, factos estes descritos na literatura. Nesse sentido, os estudos *in vitro* realizados revelam a capacidade de ambos os fármacos interagirem com as membranas lipídicas e, dessa forma, justificam a sua capacidade de interagirem com os receptores membranares responsáveis pelas suas principais acções terapêuticas.

Diversas patologias cardiovasculares estão associadas a problemas de aterosclerose, em que estão envolvidos processos de peroxidação lipídica das membranas do endotélio arterial e vascular. O facto de se encontrar descrita a actividade antioxidante para estes compostos, faz com que sejam utilizados no tratamento deste tipo

de patologias, sendo esta actividade antioxidante sinérgica ao seu efeito terapêutico. Têm sido apontados diversos motivos para a actividade antioxidante, para além da já mencionada actividade *scavenger* dos radicais oxidantes. Paralelamente a esta actividade *scavenger*, são também apontados, como possíveis mecanismos antioxidantes, a capacidade de alterar a fluidez membranar, uma vez que esta alteração afecta a mobilidade das espécies reactivas e afecta a peroxidação. Neste sentido, também neste estudo se verificou uma correlação com este efeito, uma vez que ambos os compostos se mostraram capazes de fluidificar a membrana, efeito este mais visível para o propranolol, capaz de reduzir a temperatura de transição de fase em cerca de 4°C.

Estas conclusões gerais mostram, no fundo, uma importante interacção destes fármacos com a membrana e, também, a adequabilidade dos ensaios *in vitro* para o estudo desta interacção, sendo os seus resultados correlacionáveis com os efeitos farmacológicos dos fármacos em estudo.

Contudo, é possível ir mais além, e tecer algumas conclusões para cada fármaco, em particular.

Então, para o **acebutolol** é possível dizer que:

- É descrito como um fármaco menos lipofílico que o propranolol. Estudos *in vitro* de determinação da lipofilia do fármaco atribuem-lhe baixos coeficientes de partilha membranar, baseados em estudos efectuados em sistemas bifásicos simples do tipo octanol/água. No entanto, estes estudos não são eficientes para prever a interacção lipídica que ocorre *in vivo*, nem são capazes de justificar como é que a baixa lipofilia do fármaco justificaria a sua elevada absorção e distribuição lipídica *in vivo*. Nos estudos realizados no âmbito deste trabalho, a determinação do coeficiente de partição do acebutolol torna evidente que a partição descrita nos sistemas octanol/água não é representativa da partição membranar.

- Apresenta, relativamente ao propranolol, uma maior penetração ao nível das cabeças polares, que está de acordo com o que já havia sido descrito na literatura. Esta interpenetração nas cabeças polares justifica, por um lado, o maior coeficiente de partição observado para o acebutolol e, por outro, o maior efeito ao nível da ordem e cooperatividade da transição de fase avaliadas pela sonda TMA-DPH. Esta maior interpenetração, verificada ao nível das cabeças polares, parece ser justificada pela própria estrutura molecular do composto, que sendo menos volumoso é capaz de uma maior penetração membranar.

Quanto ao **propranolol**, as conclusões que se podem retirar dos estudos efectuados são que:

- O propranolol apresenta um efeito mais acentuado ao nível da carga superficial membranar. Este efeito verifica-se, tanto pelos estudos de determinação do potencial zeta, como pelos estudos de ligação da sonda ANS à membrana. Este efeito é correlacionável com o efeito anestésico descrito para este fármaco. De facto o mecanismo de acção dos anestésicos tem sido atribuído a interacções inespecíficas com a membrana lipídica que envolvem a alteração da condução eléctrica dos estímulos e a modificação do potencial de superfície membranar.

A distribuição membranar do propranolol é normalmente descrita como totalmente hidrofóbica, com a presença dos anéis naftalénico ao nível da região hidrocarbonada da membrana, e a maioria dos estudos não contabiliza o efeito da contribuição electrostática. Contudo, esta contribuição electrostática, já que o fármaco a pH fisiológico encontra-se maioritariamente carregado positivamente, é muito importante para perceber a interacção com diferentes tipos de estruturas membranares existentes ao nível biológico.

O trabalho até aqui realizado, permitiu reflectir sobre novos caminhos, que abrem portas a novos estudos. Assim, seguidamente faz-se uma breve reflexão sobre as **perspectivas futuras** que este trabalho pode proporcionar.

O efeito da concentração de fármaco na partição deve ser estudado mais aprofundadamente, uma vez que foi descrito que fenómenos de bioacumulação ao nível da superfície membranar podem alterar a distribuição do fármaco, tanto pela fluidificação membranar (que torna a membrana mais permeável à penetração do fármaco), como por fenómenos de repulsão electrostática (por excesso de concentração membranar de fármaco.)

Seria, também interessante, realizar estudos a valores de pH diferentes de 7,4, de modo a mimetizar os diversos ambientes membranares com que os fármacos terão que interagir (exemplo: pH soro = 7,4; pH lisossomas =4,5; pH mitocôndria =8, pH no lúmen gástrico = 1,2-2 e até 5 no interior das células gástricas; pH intestinal= 5-8).

Por outro lado, a realização de estudos com outros exemplares de fármacos cardiovasculares, permitiria tornar mais consistente uma possível relação estrutura-actividade, de acordo com as diferentes interacções com as membranas.

O facto de o desenvolvimento de novo fármacos ser uma das razões para o estudo da interacção fármaco-membrana, seria útil a optimização dos estudos realizados, de forma a poderem constituir estudos de *screening* de compostos de interesse farmacêutico, nomeadamente, na previsão da sua partição membranar e influência nas propriedades biofísicas da membrana.

Das conclusões acima expostas, pode dizer-se que os estudos que utilizam modelos membranares para mimetizar as membranas biológicas foram úteis na verificação da existência de interacções importantes do acebutolol e propranolol com a membrana, passíveis de explicar alguns dos seus efeitos farmacológicos. Por outro lado, as informações obtidas com este trabalho mostram a importância das alterações na biofísica membranar, abrindo portas para que outros estudos possam ser equacionados, de modo a complementarem as informações até aqui obtidas.

A integração das diferentes abordagens a nível membranar, contemplando a genómica, proteómica e lipidómica, pode ser o caminho mais árduo, mas talvez o mais correcto para o entendimento da complexa dimensão membranar.

VI. Bibliografia

1. Seydel JK, Wiese M. Drug-Membrane Interactions: Analysis, Drug Distribution, Modeling. Mannhold R, Kubinyi H, Folkers G, editors. Weinheim: Wiley-VCH Verlag; 2002.
2. Kansy M, Fischer K, Kratzat F, Senner B, Wagner B, Parilla I. High-throughput artificial membrane permeability studies in early lead discovery and development. Testa B, van De Waterbeemd H, Folkers G, Guy R, editors. Weinheim and Zürich, Germany: Willey-VCH & Verlag Helvetica Chimica Acta; 2001.
3. Andresen TL, Jensen SS, Jorgensen K. Advanced strategies in liposomal cancer therapy: problems and prospects of active and tumor specific drug release. *Prog Lipid Res.* 2005 Jan;44(1):68-97.
4. Martins JD, Jurado AS, Moreno AJ, Madeira VM. Comparative study of tributyltin toxicity on two bacteria of the genus *Bacillus*. *Toxicol In Vitro.* 2005 Oct;19(7):943-9.
5. Little EE, Greenberg BM, DeLonay AJ, Effects ACE-oB, Environmental F, Environmental T, et al., editors. Environmental toxicology and risk assessment. seventh volume; 1998; West Conshohocken, PA. ASTM.
6. Ford JM, Hait WN. Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer. *Pharmacol Rev.* 1990 Sep;42(3):155-99.
7. Bosch I, Croop J. P-glycoprotein multidrug resistance and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1996 Oct 9;1288(2):F37-54.
8. Gottesman MM, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem.* 1993;62:385-427.
9. Omote H, Al-Shawi MK. Interaction of transported drugs with the lipid bilayer and P-glycoprotein through a solvation exchange mechanism. *Biophys J.* 2006 Jun 1;90(11):4046-59.
10. Ambudkar SV, Kimchi-Sarfaty C, Sauna ZE, Gottesman MM. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene.* 2003 Oct 20;22(47):7468-85.
11. Borst P, Elferink RO. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem.* 2002;71:537-92.
12. Leslie EM, Deeley RG, Cole SP. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005 May 1;204(3):216-37.
13. Bergethon PR, Simons ER. *Biophysical Chemistry - Molecules to Membranes.* New York: Springer-Verlag; 1990.
14. Seddon AM, Casey D, Law RV, Gee A, Templar RH, Ces O. Drug interactions with lipid membranes. *Chem Soc Rev.* 2009 Sep;38(9):2509-19.
15. Bergethon PR, Simons ER. *Biophysical Chemistry - Molecules to Membranes.* Berlin: Springer-Verlag; 1989.
16. Houslay MD, Stanley KK. *Dynamics of Biological Membranes – influence os syntesis, struture and function.* Jonh Wiley & Sons. 1982.
17. Yeagle PL. *The membranes of cells.* California: Academic Press; 1993.
18. <http://www.mpikg.mpg.de/lipowsky>.
19. Vigh L, Escriba PV, Sonnleitner A, Sonnleitner M, Piotto S, Maresca B, et al. The significance of lipid composition for membrane activity: new concepts and ways of assessing function. *Prog Lipid Res.* 2005 Sep;44(5):303-44.
20. Escriba PV. Membrane-lipid therapy: a new approach in molecular medicine. *Trends in Molecular Medicine.* 2006 Jan;12(1):34-43.
21. Escriba PV, Gonzalez-Ros JM, Goni FM, Kinnunen PKJ, Vigh L, Sanchez-Magraner L, et al. Membranes: a meeting point for lipids, proteins and therapies. *J Cell Mol Med.* 2008 Jun;12(3):829-75.

22. Jones MN, Chapman D. Micelles, monolayers and biomembranes. New York: Wiley-Liss Inc.; 1995.
23. Atwood D, Florence AT. Surfactant systems. Their chemistry, pharmacy and biology. New York: Chapman e Hall; 1983.
24. Pramauro E, Pelizzetti E. Surfactants in analytical chemistry. Applications of organized amphiphilic media. New York: Elsevier; 1996.
25. Small DM. Handbook of Lipid Research. London: Plenum Press; 1998.
26. Lasic DD. Liposomes - from Physics to Applications. New York: Elsevier; 1993.
27. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Molecular Biology of the Cell. 3rd edition ed. New York Garland Publishing; 1994.
28. Lasic DD. Liposomes. Science & Medicine. 1996;3(3):34-43.
29. Lasic DD, Needham D. The "stealth" liposome: a prototypical biomaterial. Chemical reviews. 1995;95:2601-28.
30. Rosoff M. Vesicles. New York: Marcel Dekker; 1996.
31. Small DM. The Physical Chemistry of Lipids - from Alkanes to Phospholipids. New York: Plenum Press; 1988.
32. Tanford C. The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes. Florida: Krieger publishing company; 1991.
33. Lúcio M, Reis S, LIMa JL. Drug-membrane interactions: molecular mechanisms underlying therapeutic and toxic effects of drugs. Pignataro B, editor. Weinheim: Wiley-VCH Verlag; 2010.
34. Heller H, Schaefer M, Schulten K. Molecular dynamics simulation of a bilayer of 200 lipids in the gel and in the liquid crystal phases. The Journal of Physical Chemistry. 1993;97:8343-60.
35. Gunstone FD, Harwood JL, Padley FB. The Lipid Handbook. 2nd edition ed. New York: Chapman & Hall; 1994.
36. Jones MN. Biochemical thermodynamics. London: Elsevier; 1981.
37. Shinitzky M. Biomembranes: Physical Aspects. Germany: VCH-Verlagsgesellschaft; 1996.
38. Shinitzky M, Barenholz Y. Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization. Biochimica et Biophysica Acta. 1978;515:367-94.
39. Shinitzky M, Inbar M. Microviscosity parameters and protein mobility in biological membranes. Biochimica et biophysica acta. 1976;433:133-49.
40. Fendler JH. Membrane Mimetic Chemistry. New York: John Wiley & Sons; 1983.
41. Ferreira H, Lúcio M, Siquet C, Reis S. Utilização de modelos membranares na avaliação da actividade de fármacos. QUÍMICA. 2005;99:39-51.
42. Jesorka A, Orwar O. Liposomes: Technologies and Analytical Applications. Annu Rev Anal Chem. 2008;1(1):801-32.
43. Arshady R. Preparation & chemical applications. London: Citus Books; 1999.
44. Lasic DD. The mechanism of vesicle formation. Biochemical Journal. 1988;256:1-11.
45. New RRC. Liposomes - a practical approach. New York: Oxford University Press; 1990.
46. Cevc G. Membrane electrostatics. Biochimica et Biophysica Acta. 1990;1031:311-82.
47. Sharma A, Sharma US. Liposomes in drug delivery: Progress and limitations. International Journal of Pharmaceutics. 1997;154(2):123-40.
48. Reis S, Lucio M, Segundo M, Lima JL. Use of liposomes to evaluate the role of membrane interactions on antioxidant activity. Methods Mol Biol. 606:167-88.
49. Lucio M, Lima JL, Reis S. Drug-membrane interactions: significance for medicinal chemistry. Curr Med Chem. 17(17):1795-809.
50. Santos NC, Castanho MARB. Lipossomas: a bala mágica acertou? Química Nova. 2002;25.
51. Perkins WR, Minchey SR, Ahl PL, Janoff AS. The determination of liposome captured volume. Chemistry and Physics of Lipids. 1993;64:197-217.

52. Lasic DD, Ceh B, Stuart MC, Guo L, Frederik PM, Barenholz Y. Transmembrane gradient driven phase transitions within vesicles: lessons for drug delivery. *Biochim Biophys Acta*. 1995 Nov 1;1239(2):145-56.
53. <http://www.avantilipids.com/>. [cited 2010 01/06/10]; Available from.
54. Grit M, Crommelin DJA. Chemical stability of liposomes: implications for their physical stability. *Chemistry and Physics of Lipids*. 1993;64:3-19.
55. Matos C. Interação de fármacos com lipossomas. Efeito nas propriedades físico-químicas [Tese de Doutoramento]. Porto: Universidade do Porto; 2001.
56. Mansilha CIGR. Estudos de partição e localização de fármacos em lipossomas por técnicas espectroscópicas [Tese de Doutoramento]. Porto: Universidade do Porto; 2002.
57. Bagatolli LA, Gratton E. A correlation between lipid domain shape and binary phospholipid mixture composition in free standing bilayers: A two-photon fluorescence microscopy study. *Biophysical Journal*. 2000;79(1):434-47.
58. Haverstick DM, Glaser M. Visualization of Ca^{2+} -induced phospholipid domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987;84(13):4475-9.
59. Heinrich V, Bozic B, Svetina S, Zeks B. Vesicle deformation by an axial load: from elongated shapes to tethered vesicles. *Biophysical Journal*. 1999 76(4):2056-71.
60. Margolis LB. Cell interaction with model membranes. Probing, modification and simulation of cell surface functions. Review. *Biochimica et biophysica acta*. 1984 779(2):161-89.
61. Mouritsen OG, Jörgensen K. Dynamical order and disorder in lipid bilayers. *Chemistry and Physics of Lipids*. 1994;73:3-25.
62. Welti R, Glaser M. Lipid domain in model and biological membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*. 1994;73:121-37.
63. Chang TMS. Artificial blood: A prospective. *Trends in biotechnology*. 1999;17:61-7.
64. Lichtenberg D, Barenholz Y. Liposomes: preparation, characterization, and preservation. *Methods of biochemical analysis*. 1988;33:337-462.
65. Sallovitz JM, Menghini MIZ, Lanusse CE. Impact of liposomes as delivery systems in veterinary medicine. *Veterinary research*. 1998;29(5):409-30.
66. Winslow RM. New transfusion strategies: red cell substitutes. *Annual review of medicine*. 1999;50:337-53.
67. Katzung BGea. *Basic & Clinical Pharmacology*. 7 th ed. Katzung BG, editor. New York: McGraw-Hill; 1998.
68. Butler S, Wang R, Wunder SL, Cheng HY, Randall CS. Perturbing effects of carvedilol on a model membrane system: role of lipophilicity and chemical structure. *Biophys Chem*. 2006 Feb 1;119(3):307-15.
69. http://www.ch.ic.ac.uk/local/projects/j_hettich/salbutamol/noframes/nfsynthesis.html. [cited 2010 04/06/2010]; Available from.
70. Betageri GV, Theriault Y, Rogers JA. NMR study of the interaction of beta-blockers with sonicated dimyristoylphosphatidylcholine liposomes in the presence of praseodymium cation. *Membr Biochem*. 1989;8(4):197-206.
71. <http://www.infarmed.pt/prontuario/index.php>. [cited 2010 04/06/10]; Available from.
72. Moffat AC. *Clarke's Isolation and Identification of Drugs*. 2nd ed. Moffat AC, editor. London, UK: The Pharmaceutical Press; 1986.
73. Sweetman SC. *Martindale The Complete Drug Reference*. 33rd ed. Sweetman SC, editor. London, UK: Pharmaceutical Press; 2002.
74. Akiyama S, Igisu H. Effects of d,l-propranolol and other beta adrenergic receptor blocking agents on membrane fluidity of erythrocytes. *Jpn J Pharmacol*. 1979 Feb;29(1):144-6.
75. <http://www.drugs.com/mtm/acebutolol.html>. [cited 2010 04/06/10]; Available from.
76. Loura LMS, de Almeida RFM, Coutinho A, Prieto M. Interaction of peptides with binary phospholipid membranes: application of fluorescence methodologies. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2003;122(1-2):77-96.

77. Sousa C, Nunes C, Lucio M, Ferreira H, Lima JLFC, Tavares J, et al. Effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the cellular membrane fluidity. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008 Aug;97(8):3195-206.
78. Lucio M. Estudos de anti-inflamatórios não esteróides em modelos membranares. Porto: University of Porto; 2006.
79. Slavic J. Fluorescent probes in cellular and molecular biology. Michigan CRC Press: Ann Arbor; 1994.
80. Lakowicz JR. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3rd ed. ed. New York: Springer; 2006.
81. Neves P, Lopes SCDN, Sousa I, Garcia S, Eaton P, Gameiro P. Characterization of membrane protein reconstitution in LUVs of different lipid composition by fluorescence anisotropy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2009;49(2):276-81.
82. Lentz BR, Barenholz Y, Thompson TE. Fluorescence depolarization studies of phase transitions and fluidity in phospholipid bilayers. 1. Single component phosphatidylcholine liposomes. *Biochemistry*. 1976;15(20):4521-8.
83. Kaiser RD, London E. Location of diphenylhexatriene (DPH) and its derivatives within membranes: comparison of different fluorescence quenching analysis of membrane depth. *Biochemistry*. 1998;37:8180-90.
84. Rodrigues C, Gameiro P, Prieto M, Castro B. Interaction of rifampicin and isoniazid with large unilamellar liposomes: spectroscopic location studies. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2002;1620:151-9.
85. Merino S, Vázquez JL, Domínguez A, Berlanga M, Viñas M, Montero MT, et al. Fluoroquinolone-Biomembrane Interaction at the DPPC/PG Lipid-Bilayer Interface. *Langmuir*. 2002;18(8):3288-92.
86. Engelke M, Bojarski P, Bloß R, Diehl H. Tamoxifen perturbs lipid bilayer order and permeability: comparison of DSC, fluorescence anisotropy, Laurdan generalized polarization and carboxyfluorescein leakage studies. *Biophysical Chemistry*. 2001;90(2):157-73.
87. Moribe K, Maruyama K, Iwatsuru M. Molecular localization and state of amphotericin B in PEG liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*. 1999;193(1):97-106.
88. Santaella C, Vierling P. Molecular order and mobility within liposomal membrane made from highly fluorinated phospholipids. *Chemistry and Physics of Lipids*. 1995;77(2):173-7.
89. Vázquez JL, Montero MT, Merino S, Domínguez A, Berlanga M, Viñas M, et al. Location and Nature of the Surface Membrane Binding Site of Ciprofloxacin: A Fluorescence Study. *Langmuir*. 2001;17(4):1009-14.
90. Gasymov OK, Glasgow BJ. ANS fluorescence: potential to augment the identification of the external binding sites of proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Mar;1774(3):403-11.
91. Au S, Weiner N, Schacht J. Membrane perturbation by aminoglycosides as a simple screen of their toxicity. *Antimicrob Agents Chemother*. 1986 Sep;30(3):395-7.
92. Hendrich AB, Stanczak K, Komorowska M, Motohashi N, Kawase M, Michalak K. A study on the perturbation of model lipid membranes by phenoxazines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2006;14(17):5948-54.
93. Jaspreet KV, Maram KR, Vinod DL. Nanosystems in Drug Targeting: Opportunities and Challenges. *Current Nanoscience*. 2005;1:47-64.
94. Ziegler A, Mohr KMD, Bieger DMD. Color Atlas of Pharmacology 2th ed. Lullmann H, editor. New York: Thieme Stuttgart; 2000.
95. Roden DM, George Jr AL. The genetic basis of variability in drug responses. *Nat Rev Drug Discov*. 2002;1(1):37-44.
96. van Balen GP, Martinet CM, Caron G, Bouchard G, Reist M, Carrupt PA, et al. Liposome/water lipophilicity: methods, information content, and pharmaceutical applications. *Med Res Rev*. 2004 May;24(3):299-324.

97. Castro B, Gameiro P, Lima JLFC, Matos C, Reis S. A fast and reliable spectroscopic method for the determination of membrane-water partition coefficients of organic compounds. *Lipids*. 2001;36:89-96.
98. Rodrigues C, Gameiro P, Reis S, Lima JL, de Castro B. Derivative spectrophotometry as a tool for the determination of drug partition coefficients in water/dimyristoyl-L-alpha-phosphatidylglycerol (DMPG) liposomes. *Biophys Chem*. 2001 Dec 11;94(1-2):97-106.
99. Pauletti GM, Wunderli-Allenspach H. Partition coefficients in vitro: artificial membranes as a standardized distribution model. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1994;1:273-82.
100. Silburn KA, McPhee DA, Maerz AL, Poubourios P, Whittaker RG, Kirkpatrick A, et al. Efficacy of fusion peptide homologs in blocking cell lysis and HIV-induced fusion. *AIDS Res Hum Retrovir*. 1998 Mar 20;14(5):385-92.
101. Carmona-Ribeiro AM. Interactions between cationic liposomes and drugs or biomolecules. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2000;72:39-44.
102. Santos NC, Prieto M, Castanho MA. Quantifying molecular partition into model systems of biomembranes: an emphasis on optical spectroscopic methods. *Biochim Biophys Acta*. 2003 Jun 10;1612(2):123-35.
103. Kitamura K, Imayoshi N, Goto T, Shiro H, Mano T, Nakai Y. Second Derivative Spectrophotometric Determination of Partition Coefficients of Chlorpromazine and Promazine Between Lecithin Bilayer Vesicles and Water. *Analytica Chimica Acta*. 1995;304:101-6.
104. Lopes AMG. Partição de Xenobióticos Orgânicos em Agregados Anfífilos. Uma Proposta de Novos Previsores de Bioconcentração [Tese de Doutoramento]. Lisboa: Universidade Nova de Lisboa; 1997.
105. Omran AA, Kitamura K, Takegami S, El-Sayed AA, Abdel-Mottaleb M. Determination of partition coefficients of diazepam and flurazepam between phosphatidylcholine bilayer vesicles and water by second derivative spectrophotometric method. *J Pharm Biomed Anal*. 2001 May;25(2):319-24.
106. Rodrigues C, Gameiro P, Reis S, Lima JLFC, Castro B. Spectrophotometric determination of drug partition coefficients in dimyristoil-L- α -phosphatidylcholine/water: a comparative study using phase separation and liposome suspensions. *Analytica Chimica Acta*. 2001;428:103-9.
107. Di Giulio A, Maurizi G, Saletti MA, Amicosante G, Mazzeo P, Oratore A. The ultraviolet derivative spectrophotometric determination of neutral liposome-entrapped β -lactam antibiotics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1989;7:1159-64.
108. Mansilha CIGRd. Estudos de partição e localização de fármacos em lipossomas por técnicas espectroscópicas. Porto: University of Porto; 2002.
109. Karpinska J. Derivative spectrophotometry-recent applications and directions of developments. *Talanta*. 2004 Nov 15;64(4):801-22.
110. Ferreira H, Lúcio M, Castro B, Gameiro P, Lima JLFC, Reis S. Partition and location of nimesulide in EPC liposomes: a spectrophotometric and fluorescence study *Analytica and Bioanalytical Chemistry*. 2003;377:293-8.
111. Rodrigues C, Gameiro P, Reis S, Lima JLFC, Castro B. Derivative spectrophotometry as a tool for the determination of drug partition coefficients in water/dimyristoyl-L- α -phosphatidylglycerol (DMPG) liposomes. *Biophysical Chemistry*. 2001;94:97-106.
112. Lucio M, Ferreira H, Lima JLFC, Matos C, de Castro B, Reis S. Influence of some anti-inflammatory drugs in membrane fluidity studied by fluorescence anisotropy measurements. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2004 Apr 7;6(7):1493-8.
113. Ferreira H, Lucio M, Lima JLFC, Matos C, Reis S. Effects of diclofenac on EPC liposome membrane properties. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2005 Jul;382(5):1256-64.

114. Ferreira H, Lúcio M, Lima JLFC, Matos C, Reis S. Interaction of clonixin with EPC liposomes used as membrane models. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2005;94(6):1277 - 87.
115. Chakraborty H, Roy S, Sarkar M. Interaction of oxacam NSAIDs with DMPC vesicles: differential partitioning of drugs. *Chem Phys Lipids*. 2005 Dec;138(1-2):20-8.
116. Phillips MC. The physical state of phospholipids and cholesterol in monolayers, bilayers, and membranes. *Progress in Surface Membrane Science* 1972;5:139-221.
117. Wiseman H, Cannon M, Arnstein HRV, Barlow DJ. The Structural Mimicry of Membrane Sterols by Tamoxifen - Evidence from Cholesterol Coefficients and Molecular-Modeling for Its Action as a Membrane Antioxidant and an Anticancer Agent. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 1992 Mar 20;1138(3):197-202.
118. Cervato G, Viani P, Masserini M, Di Iorio C, Cestaro B. Studies on peroxidation of arachidonic acid in different liposomes below and above phase transition temperature. *Chemistry and Physics of Lipids*. 1988;49:135-9.
119. Horan KL, Lutzke BS, Cazars AR, McCall JM, Epps DE. Kinetic evaluation of lipophilic inhibitors of lipid peroxidation in DLPC liposomes. *Free Radical Biology and Medicine*. 1994;17:587-96.
120. Ferreira H, Lucio M, Lima JLFC, Cordeiro-da-Silva A, Tavares J, Reis S. Effect of anti-inflammatory drugs on splenocyte membrane fluidity. *Analytical Biochemistry*. 2005 Apr 1;339(1):144-9.
121. Caboi F, Amico GS, Pitzalis P, Monduzzi M, Nylander T, Larsson K. Addition of hydrophilic and lipophilic compounds of biological relevance to the monoolein:water system. I. Phase behavior. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2001;109:47-62.
122. Denich TJ, Beaudette LA, Lee H, Trevors JT. Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *J Microbiol Methods*. 2003 Feb;52(2):149-82.
123. Ghosh AK, Basu R, Dey S, Das S, Nayak NP, Barat B, et al. Lipid-disordering effect of aspirin on the liposomal membrane of dipalmitoyl phosphatidyl choline -- A fluorescence anisotropy study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 1995;4(5):309-11.
124. Ghosh AK, Pore N, Basu R, De S, Nandy P. Lipid perturbation by corticosteroids: An anisotropic study. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*. 1996 Jul 31;7(1-2):65-8.
125. Grancelli A, Morros A, Cabanas ME, Domenech O, Merino S, Vazquez JL, et al. Interaction of 6-fluoroquinolones with dipalmitoylphosphatidylcholine monolayers and liposomes. *Langmuir*. 2002 Nov 26;18(24):9177-82.
126. Beccerica E, Piergiacomini G, Curatola G, Ferretti G. Effect of antirheumatic drugs on lymphocyte membrane fluidity in rheumatoid arthritis: a fluorescence polarization study. *Pharmacology*. 1989;38:16-22.
127. Ma JY, Ma JK, Weber KC. Fluorescence studies of the binding of amphiphilic amines with phospholipids. *J Lipid Res*. 1985 June 1, 1985;26(6):735-44.
128. Xu R. Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. *Particuology*. 2008;6(2):112-5.
129. Jones MN. The surface properties of phospholipid liposome systems and their characterisation. *Adv Colloid Interface Sci*. 1995 Jan 3;54:93-128.
130. Delgado AV, Gonzalez-Caballero F, Hunter RJ, Koopal LK, Lyklema J. Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena. *J Colloid Interface Sci*. 2007 May 15;309(2):194-224.
131. Woodle MC, Papahadjopoulos D. Liposome Preparation and Size Characterization. Lester Packer e Sidney Fleischer, editor. London: Academic Press; 1997.
132. Jesorka A, Orwar O. Liposomes: Technologies and Analytical Applications. *Annu Rev Anal Chem*. 2008;1:801-32.
133. Hope MJ, Bally MB, Webb G, Cullis PR. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochimica et biophysica acta*. 1985;812:55-65.

134. Mayer LD, Hope MJ, Cullis PR. Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. *Biochimica et biophysica acta*. 1986 161-168;858(1).
135. Chalpin DB, Kleinfeld AM. Interaction of fluorescence quenchers with the n-(9-anthroyloxy) fatty acid membrane probes *Biochimica et Biophysica Acta*. 1983;731(2):465-74.
136. Pauletti GM, Wunderli-Allenspach H. Partition coefficients in vitro: artificial membranes as a standardized distribution model. *Eur J Pharm Sci*. 1994;1(5):273-82.
137. Lindenberg M, Kopp S, Dressman JB. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. *Eur J Pharm Biopharm*. 2004;58(2):265-78.
138. Krzek J, KwiecieÅ„ A, Å»ylewski M. Stability of Atenolol, Acebutolol and Propranolol in Acidic Environment Depending on its Diversified Polarity. *Pharm Dev Technol*. 2006;11(4):409 - 16.
139. Sobczak H, Pawlaczyk J, Szkodo M. The effect of lipophilicity of β -adrenolytic drugs on their sorption on medicinal charcoal. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*. 1999;56(3):187-93.
140. Savitzky A, Golay MJE. Smoothing and differentiation of data. *Analytical chemistry*. 1964;36:1627-39.
141. White SH, Jacobs RE, King GI. Partial specific volumes of lipid and water in mixtures of egg lecithin and water. *Biophysical Journal*. 1987;52:663-5.
142. Katz M, Ben-Shlush I, Kolusheva S, Jelinek R. Rapid colorimetric screening of drug interaction and penetration through lipid barriers. *Pharm Res*. 2006 Mar;23(3):580-8.
143. Krill SL, Lau KY, Plachy WZ, Rehfeld SJ. Penetration of dimyristoylphosphatidylcholine monolayers and bilayers by model beta-blocker agents of varying lipophilicity. *J Pharm Sci*. 1998 Jun;87(6):751-6.
144. Albertini G, Donati C, Phadke RS, Ponzi Bossi MG, Rustichelli F. Thermodynamic and structural effects of propranolol on DPPC liposomes. *Chem Phys Lipids*. 1990 Sep;55(3):331-7.
145. Castelli F, Grazia Sarpietro M, Messina C, De Lazzari A, Di Rosa D, Giannetto A. Differential scanning calorimetry differences in micronized and unmiconized nimesulide uptake processes in biomembrane models. *Eur J Pharm Sci*. 2003;19(4):237-43.
146. Katz M, Ben-Shlush I, Kolusheva S, Jelinek R. Rapid Colorimetric Screening of Drug Interaction and Penetration Through Lipid Barriers. *Pharm Res*. 2006;23(3):580-8.