

Jaime Amadeu Cruz Reis Samelo

ESTUDO DA INTERAÇÃO DA RIF COM BICAMADAS LIPÍDICAS

Mestrado em Química
Departamento de Química
FCTUC

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Jaime Amadeu Cruz Reis Samelo

**Estudo da interação da
RIF com
bicamadas lipídicas**

**Dissertação apresentada para prova de Mestrado em Química,
Área de especialização em Química Avançada Industrial**

Professora Doutora Maria João Moreno

Setembro 2016

Universidade de Coimbra

Agradecimentos

A dissertação de mestrado é o trabalho que de algum modo finaliza a minha etapa académica. Mas para poder dar por terminada esta caminhada não posso deixar de agradecer, a todos os que tornaram este trabalho possível.

À minha orientadora, à Professora Doutora Maria João Moreno, pela sua orientação, pelo seu rigor, pela sua disponibilidade, pela sua paciência e pela sua ajuda e por todo o conhecimento que me foi transmitindo ao longo desta jornada. Tudo isto foi crucial para o desenvolvimento deste trabalho e para a obtenção do meu grau de mestre.

Aos meus colegas de laboratório, aos que se mantêm e aos que já saíram, em especial ao Renato, que me orientou ainda na licenciatura mas que desde logo me transmitiu muito do seu conhecimento e à Julia, que com ela iniciei este trabalho e que sempre que foi necessário esteve pronta para me ajudar.

Aos meus amigos que já me acompanham desde o primeiro ano e aqueles que já me acompanhavam, um muito obrigado pelo vosso apoio e incentivo neste percurso.

E por fim agradecer à minha família, aos meus pais que me deram a oportunidade realizar este mestrado e que sempre mostraram interesse e ao meu irmão me incentivou ao longo deste percurso. Sem a ajuda deles de certeza que não conseguiria realizar esta caminhada.

Índice

Abstract	I
Resumo	III
Abreviaturas	V
Índice de figuras	VI
Índice de tabelas	XI
Índice de equações	XIII
I. Introdução	
I.1 Membrana biológica – Importância e composição	1
I 1.1 Características e funções	1
I 1.2 Breve introdução histórica das membranas	2
I.1.2.1 Estudos de interface	2
I.1.3 Membrana lipídica – Evolução dos modelos	3
I.1.4 Lípidos	5
I.1.4.1 Lípidos da membrana biológica	5
I.1.5 Formação da bicamada lipídica – Efeito hidrofóbico	7
I.1.6 Formação de lipossomas	8
I.1.6.1 Lipossomas	12
I.2 Interação de anfífilas com a bicamada lipídica	13
I.3 Rifampicina	14
I.3.1 Propriedades físico - químicas	15
I.3.2 Estabilidade	15
I.3.3 Propriedades farmacocinéticas da RIF	16
I.3.4 RIF, mecanismo de ação	18
II. Material e métodos	
II.1 Material	23
II.1.1 Reagentes	23
II.1.2 Soluções tampão	23
II.1.3 Equipamento	24
II.2 Métodos	24

II.2.1	Preparação de LUV's por extrusão	25
II.2.2	Análise da concentração de lípido	25
II.2.3	Calorimetria de titulação isotérmica	26
II.2.3.1	Correção do efeito electrostático	29
II.2.4	Espectroscopia de absorção Ultravioleta/Visível	30
II.2.5	Espectroscopia de fluorescência	32
II.2.5.1	Preparação de LUV's com CBF	35
II.2.5.2	Cromatografia de exclusão	35
II.2.6	Dispersão dinâmica de luz	35
III.	Resultados e discussão	
III.1	Estudo da partição da RIF para membranas de lipídicas de POPC	41
III.2	Determinação da variação da ionização da RIF devido à partição para bicamada de POPC	43
III.3	Acessibilidade da RIF ao lípido	46
III.4	Efeito da concentração da RIF	49
III.4.1	Interação da RIF com bicamadas lipídicas de POPC	49
III.4.2	Interação da RIF com bicamadas lipídicas representativas de membranas bacterianas	57
III.5	Perturbação da membrana	62
III.5.1	Dispersão dinâmica de luz	62
III.5.2	Efeito da RIF na cinética de permeação da CBF	65
IV.	Conclusão	73
V.	Bibliografia	77

Abstract

After oral administration, a drug must overcome several barriers before reaching the systemic circulation. In addition to the effect of absorption, the distribution, metabolism and elimination (ADME) of the drug also involves interaction and/or permeation through biological membranes. Also, the efficacy once at the target site involves frequently interactions with biological membranes; either directly in the case of drugs active in the membrane, or indirectly through an increase or decrease in the local concentration available to interact with the therapeutic target.

Biological membranes are formed by a continuous lipid bilayer, with proteins embedded in it, or adsorbed at its polar surface. The diffusion barrier that limits the permeability of drugs through biological membranes is given by the lipid bilayer.

For most drugs (hydrophobic and amphiphilic), non-specific interactions are also established with the lipid bilayer portion of biological membranes. It is therefore important to characterize the interactions established between the drug and model systems that mimic the lipid bilayer portion of the biological membrane, as well as the effect of the drug in the properties of the bilayer.

Large Unilamellar Vesicles (LUVs) are excellent models systems, as they are stable and can be prepared with distinct lipid compositions to mimic the properties of the relevant biological membrane (namely its dynamic and electrostatic properties).

In this work we have characterized the interaction of Rifampicin (Rif) with LUVs prepared from pure POPC (mimicking membranes in general) and from a mixture of POPE/POPC/POPG at 50:30:20 molar % (as a model of bacterial membranes). Rifampicin is an antibiotic widely used to treat tuberculosis, which acts by suppressing the synthesis of RNA causing the destruction of bacterial cells.

The interaction of Rif with the lipid bilayers was studied by isothermal titration calorimetry (ITC); with the characterization of the partition coefficient and associated enthalpy variation at distinct local concentrations of the drug, changes in the ionization state of Rif when interacting with the lipid bilayer, and qualitative information regarding the rate of permeation. A preliminary test to determine the partition coefficient was also done by absorption spectroscopy in the UV/Visible.

Variations in the properties of the lipid bilayers due to the presence of distinct local concentrations of Rif were evaluated by Dynamic Light Scatter and through the effect on the rate of carboxyfluorescein permeation.

Resumo

Após administração oral um fármaco tem de ultrapassar várias barreiras antes de chegar ao sistema circulatório. Para além do efeito na sua absorção, a distribuição, metabolismo e eliminação (ADME) do fármaco também envolve a interação e/ou permeação através de membranas biológicas. Também a eficácia no local alvo envolve frequentemente interações com a membrana biológica, quer via direta no caso de medicamentos ativos na membrana, quer indiretamente através do aumento ou diminuição da concentração local disponível para interagir com o alvo terapêutico.

As membranas biológicas são formadas por uma bicamada lipídica contínua com proteínas incorporadas ou adsorvidas na superfície polar. A barreira de difusão que limita a permeabilidade dos fármacos através da membrana biológica é dada pela bicamada lipídica.

Para a maioria dos medicamentos (hidrofóbicos e anfifílicos) as interações não específicas também são estabelecidas com a bicamada lipídica da membrana biológica. Por conseguinte, é importante caracterizar as interações estabelecidas entre o fármaco e sistemas modelo que mimetizem a porção da bicamada lipídica da membrana biológica, bem como o efeito do fármaco nas propriedades da bicamada.

Vesículas unilamelares largas (LUV'S) são sistemas modelo excelentes, uma vez que são estáveis e podem ser preparados com composições distintas de lípidos que mimetizem as propriedades relevantes da membrana biológica (nomeadamente as suas propriedades dinâmicas e electrostáticas)

Neste trabalho caracterizámos as interações da Rifampicina (RIF) com LUV'S preparados com POPC puro (mimetizando as membranas em geral) e a partir de uma mistura de POPE:POPC:POPG a 50:30:20 molar % (como um modelo de uma membrana bacteriana).

A Rifampicina é um antibiótico amplamente usado na tratamento da tuberculose, atuando na inibição da síntese do RNA dependente do DNA causando a destruição das células bacterianas.

A interação da RIF com a bicamada lipídica foi estudada através de calorimetria de titulação isotérmica (ITC), com a caracterização do coeficiente de partição e a variação da entalpia associada para diferentes concentrações locais do fármaco, mudanças no

estado de ionização da RIF devido à interação com a bicamada lipídica, e informação qualitativa sobre a velocidade de permeação através da bicamada.

Um ensaio preliminar para determinar o coeficiente de partição foi efetuado utilizando espectroscopia de absorção UV/Visível. Variações nas propriedades da bicamada lipídica devido à presença de diferentes concentrações locais de RIF foram avaliadas por dispersão dinâmica de luz e através do efeito na velocidade de permeação da carboxifluoresceína.

A Rifampicina é um antibiótico amplamente usado na tratamento da tuberculose, atuando na inibição da síntese do RNA dependente do DNA causando a destruição das células bacterianas.

A interação da RIF com a bicamada lipídica foi estudada através de calorimetria de titulação isotérmica (ITC), com a caracterização do coeficiente de partição e a variação da entalpia associada para diferentes concentrações locais do fármaco, mudanças no estado de ionização da RIF devido à interação com a bicamada lipídica, e informação qualitativa sobre a velocidade de permeação através da bicamada.

Um ensaio preliminar para determinar o coeficiente de partição foi efectuado utilizando espectroscopia de absorção UV/Visível. Variações nas propriedades da bicamada lipídica devido à presença de diferentes concentrações locais de RIF foram avaliadas por espalhamento dinâmico de luz e através do efeito da velocidade de permeação da carboxifluoresceína.

Abreviaturas

POPC – 1-Palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina

POPE – 1-Palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletenoamina

POPG - 1 palmitoil-2 oleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1-rac-glicerol)

RIF – Rifampicina

CBF – 5,6 Carboxifluoresceína

K_P – Coeficiente de partição

K_P^{obs} – Coeficiente de partição observado

ΔH – Variação de entalpia

ITC – Calorimetria de titulação isotérmica

DLS – Dispersão dinâmica de luz

NBD- C_{16} – 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il com cadeia alquílica de 16 carbonos

HEPES – 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico ácido

Trizma – 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3propanodiol

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

NaCl – Cloreto de sódio

Índice de Figuras

- Figura 1:** Representação esquemática de três tipos de lípidos encontrados na membrana.
a) Fosfatidilcolina, b) Glicolípido e c) Esterol.....7
- Figura 2:** Estrutura molécula de diferentes glicerofosfolípidos. A– POPC, B– POPE, C– POPG.9
- Figura 3:** Representação dos diferentes tipos de fases que as membranas podem apresentar. Adaptação de Gennis, 1988.11
- Figura 4:** Estrutura da Rifampicina.14
- Figura 5:** Diagrama de Jablonsky.33
- Figura 6:** Espectros de fluorescência da amostra contendo POPC 0,4mM CBF 50mM, a vermelho. Curva a preto representa a fluorescência após com a adição de Triton-X 100 μ M a 25°C.34
- Figura 7.** Representação esquemática do aparelho de dispersão dinâmica de luz.....37
- Figura 8:** Titulação de RIF 10 μ M com POPC a diferentes concentrações. Painel A: Absorção da amostra de RIF com diferentes concentrações de POPC. Painel B: Os pontos representam a absorvância da RIF a 520nm e a linha é o melhor ajuste da equação 11. 41
- Figura 9:** Titulação de RIF 10 μ M com POPC a diferentes concentrações. Painel I: Termograma da titulação da RIF com diferentes concentrações de POPC. Painel II. A linha é o melhor ajuste dos resultados experimentais de acordo com as equações 1 e 2. 42
- Figura 10:** Dependência da variação de entalpia observada associada à partição de RIF para a bicamada lipídica. A linha é o melhor ajuste dos resultados experimentais

indicando uma variação na entalpia de partição intrínseca de $10,1 \pm 1,2$ kJ/mol e uma transferência de $\Delta nH^+ = -0,31 \pm 0,04$ kJ/mol.44

Figura 11: Estrutura da RIF protonada com indicação dos grupos ionizáveis e respectivos valores de pKa.45

Figura 12: Ilustração esquemática dos protocolos de *uptake* e *release*.46

Figura 13: Painel A. Curvas obtidas para as titulações de RIF com diferentes concentrações de POPC, para os protocolos uptake (O, Δ) e release (\square) a 25°C. Painel B: Ajuste para o valor do gama obtido para os protocolos de uptake e release, com intervalo de confiança de 95 e 97,5%.47

Figura 14: Redução do grupo do NBD pelo ditionito.48

Figura 15: Curva típica obtida para a distribuição do lípido na monocamada de fora e de dentro. Resultados observados por uma bicamada de POPC. A percentagem de sonda dentro e fora dos lipossomas é obtida através da reação de NBD-C₁₆ com ditionito.48

Figura 16: Titulação de RIF a diferentes concentrações com POPC. Coeficiente de partição observado, (K_p^{obs} , O) e variação da entalpia, (ΔH , Δ) obtidos pelo melhor ajuste das equações de 1 a 3 dos resultados experimentais.50

Figura 17: Titulação de RIF a diferentes concentrações com POPC. Rácio POPC_RIF_M (1ª injeção, O) e coeficiente de partição observado, (K_p^{obs} , Δ) obtidos pelo melhor ajuste das equações de 1 a 3 dos resultados experimentais.51

Figura 18: Titulação de RIF a diferentes concentrações com POPC Painel A. Curva da titulação obtida para uma [RIF]_T de 50 μ M. A linha é o melhor ajuste obtido pelas equações de 1 a 3, a 25 °C, $\gamma = 0,5$; $K_p^{obs} = 6,25 \times 10^3$, $\Delta H = -12,74$ kJ/mol. Painel B: Curva da titulação obtida para uma [RIF]_T de 100 μ M. A linha é o melhor ajuste obtido pelas equações de 1 a 3, a 25 °C, $\gamma = 0,5$; $K_p^{obs} = 5,5 \times 10^2$, $\Delta H = -4,21$ kJ/mol.52

- Figura 19:** Titulação de RIF a diferentes concentrações com diferentes concentrações de POPC. Painel A: Potencial, Ψ_0 , gerado na superfície da membrana com a titulação de RIF com POPC. Painel B: Rácio do coeficiente de partição observado com o coeficiente de partição intrínseca.53
- Figura 20:** Titulação de RIF a diferentes concentrações com diferentes concentrações de POPC. Painel A: Coeficiente de partição observado das amostras sem NaCl (Δ) e com NaCl (O) obtido pelo melhor ajuste das equações de 1 a 3. Painel B: Variação da entalpia das amostras sem NaCl (Δ) e com NaCl (O) obtida pelo melhor ajuste da equação de 1 a 3.54
- Figura 21:** Titulação de POPC a diferentes concentrações (indicadas nos painéis respetivos) com RIF 200 μ M. O painel da esquerda no topo refere-se à adição de RIF a tampão.55
- Figura 22:** Titulação de POPC a diferentes concentrações com RIF 200 μ M. Painel A: Calor gerado na titulação tendo em conta as duas primeiras injeções. A linha é o melhor ajuste das equações de 1 a 3, $K_p = 5,43 \times 10^3$, $\Delta H = -5,6$ kJ/mol. Painel B: Calor gerado na titulação tendo em conta as duas últimas injeções. A linha é o melhor ajuste das equações de 1 a 3, $K_p = 1,04 \times 10^3$, $\Delta H = -5,5$ kJ/mol.....56
- Figura 23:** Titulação de POPC a diferentes concentrações com RIF 200 μ M. Painel A: Coeficiente de partição observado (K_p^{obs} , Δ) e variação da entalpia (ΔH , O) obtido segundo as equações de 1 a 3.57
- Figura 24:** Titulação de RIF com diferentes concentrações com mistura lipídica ternária 30mM. Curva da titulação obtida para uma $[RIF]_T$ de 20 μ M. A linha é o melhor ajuste obtido pelas equações de 1 a 3 a 25 °C, $\gamma = 0,5$; $K_p^{obs} = 6,6 \times 10^2$, $\Delta H = 33,8$ kJ/mol.58
- Figura 25:** Titulação da mistura lipídica a diferentes concentrações (indicadas nos painéis respetivos) com RIF 200 μ M. O painel da esquerda no topo refere-se à adição de RIF a tampão59

Figura 26: Titulação de PE:PC:PG a diferentes concentrações com RIF 200 μM . Gráfico A: Calor gerado na titulação tendo em conta as duas primeiras injeções. A linha é o melhor ajuste das equações de 1 a 3, $K_p = 6,4 \times 10^2$, $\Delta H = 11,16 \text{ kJ/mol}$ Gráfico B: Calor gerado na titulação tendo em conta as duas últimas injeções. A linha é o melhor ajuste das equações de 1 a 3, $K_p = 5,7 \times 10^2$, $\Delta H = 9,8 \text{ kJ/mol}$60

Figura 27: Titulação da mistura lipídica a diferentes concentrações com RIF 200 μM . Painel A: Coeficiente de partição observado (K_p^{obs} , Δ) e variação da entalpia (ΔH , O) obtido segundo as equações 1 a 3.61

Figura 28: Curvas de autocorrelação normalizadas para as amostras de POPC com diferentes proporções de RIF.63

Figura 29: Curvas de autocorrelação para as amostras incubadas a diferentes tempos.64

Figura 30: Percentagem de libertação de CBF em membranas de POPC com diferentes concentrações de RIF a 25 °C. As curvas estão ajustadas por uma equação triexponencial (15). Resíduo obtido tendo em conta os dados experimentais e os dados ajustados.66

Figura 31: Resultados obtidos das cinéticas dos passos rápidos (k_1) (eixo da esquerda), médios (k_2) e lentos (k_3) (eixos da direita) com diferentes [POPC]. Os pontos foram obtidos segundo o melhor ajuste da equação 15.68

Figura 32: Percentagem de libertação de CBF em membranas de PE:PC:PG com diferentes concentrações de RIF a 25°C. As curvas estão ajustadas por uma equação triexponencial (15). Resíduo obtido tendo em conta os dados experimentais e os dados ajustados.70

Figura 33: Resultados obtidos das cinéticas dos passos rápidos (k_1) (eixo da esquerda), médios (k_2) e lentos (k_3) (eixos da direita) com diferentes [PE:PC:PG]. Os pontos foram obtidos segundo o melhor ajuste da equação 15.70

Índice de Tabelas

Tabela 1: Valores da absorvidade molar da RIF para diferentes comprimentos de onda a pH 7,4.	15
Tabela 2: Coeficiente de partição e variação na energia livre de Gibbs obtidos por espectroscopia UV/Visível a 37 °C, considerando que todo o lípido está acessível à RIF.....	41
Tabela 3: Coeficiente de partição e parâmetros termodinâmicos obtidos por ITC a 25 °C, considerando que todo o lípido está acessível à RIF.	43
Tabela 4: Parâmetros termodinâmicos e variação na ionização para a partição da RIF entre a fase aquosa e bicamadas de POPC.	44
Tabela 5: Valores da $[RIF]_M$ e do rácio POPC/ $[RIF]_M$ tendo em conta o KP otimizado para as amostras de POPC contendo diferentes $[RIF]_T$	62
Tabela 6: Diâmetros hidrodinâmicos para os lipossomas de POPC à concentração de 0,1 mM, contendo diferentes $[RIF]_T$ a 25°C.	63
Tabela 7: Diâmetros hidrodinâmicos dos lipossomas contendo RIF 100 μ M segundo uma análise unimodal, para diferentes tempos de incubação	64
Tabela 8: Diâmetros hidrodinâmicos dos lipossomas de PE:PC:PG a diferentes concentrações para uma concentração total de RIF igual a 20 μ M, a 25°C.....	65
Tabela 9: Percentagens de libertação de CBF de LUVs de POPC 0,1 mM com diferentes $[RIF]_T$ a diferentes tempos.....	69
Tabela 10: Percentagem de libertação de CFB de LUVs da mistura ternária 0,4 mM a diferentes $[RIF]_T$ a diferentes tempos.	71

Índice de Equações

Equação 1: $q(i) = \Delta H \left(n_{RIF_L}(i) - n_{RIF_L}(i-1) \left(1 - \frac{V(i)}{V_{cell}} \right) \right) + q_{dil}$

Equação 2: $K_p^{obs} = \frac{n_{RIF_L}/V_L}{n_{RIF_W}/V_W} = \frac{n_{RIF_L}/([L]\tilde{V}_L V_T)}{n_{RIF_W}/V_T}$

Equação 3: $n_{RIF_L} = n_{RIF_T} \frac{K_p^{obs} [L] \tilde{V}_L \gamma}{1 + K_p^{obs} [L] \tilde{V}_L \gamma}$

Equação 4: $[L]^*(i) = [L]^*(i-1) \left\{ 1 - \frac{V(i)}{V_{cell}} \right\} + \gamma \left\{ [L]^{Syr} \frac{V(i)}{V_{cell}} \right\}$

Equação 5: $n^*_{RIF_T}(i) = n^*_{RIF_T}(i-1) \left\{ 1 - \frac{V(i)}{V_{cell}} \right\} + \left\{ \gamma [RIF]_L^{Syr} + \gamma [RIF]_W^{Syr} \right\} V(i)$

Equação 6: $K_{p^{obs}} = K_p e^{\frac{-ZF\Psi_0}{RT}}$

Equação 7: $\sigma = \frac{\psi_0}{|\psi_0|} \sqrt{2000 \varepsilon RT \sum_i C_i \left(e^{-z_i F \Psi_0 / RT} - 1 \right)}$

Equação 8: $\sigma = e_0 \frac{\sum_j z_j \binom{n_j}{n_L}}{\sum_j A_j \binom{n_j}{n_L}}$

Equação 9: $T = \frac{P}{P_0}$

Equação 10: $A = \log \left(\frac{P_0}{P} \right) = -\log T$

Equação 11: $A = \varepsilon l c$

Equação 12: $Abs = [RIF]_T \frac{Abs_{RIF} + Abs_{RIF_POPC} K_p \tilde{V}_{POPC} [POPC]}{1 + K_p \tilde{V}_{POPC} [POPC]}$

Equação 13: $G(\tau) = \langle I(t) I(t + \tau) \rangle$

Equação 14: $D_0 = \frac{2kT}{6\pi\eta R_h}$

Equação 15: $\Delta H^{\circ,obs} = \Delta H^{\circ,part} + \Delta nH^+ \Delta H^{ionização}$

Equação 16: % lib = $a_1(1 - e^{-k_1t}) + a_2(1 - e^{-k_2t}) + a_3(1 - e^{-k_3t})$

Capítulo I

Introdução

I.1 Membrana biológica - Importância e composição

A membrana biológica é sem dúvida das estruturas mais importantes que estão presentes numa célula. Está presentes tanto em células procariontes como em células eucariontes e têm como função delimitar dois ambientes aquosos, sendo consideradas como um sistema semipermeável e seletivo.^{1,2}

As membranas biológicas são estruturas organizadas constituídas por lípidos e de proteínas, com pequenas quantidades de hidratos de carbono.

Embora tenha uma grande diversidade de lípidos, os principais constituintes das membranas são proteínas, que são responsáveis pela sua atividade bioquímica. A razão de distribuição em termos mássicos destes dois tipos de componentes nas membranas varia entre 20% e 80% de proteína. Os hidratos de carbono podem em algumas membranas ascender a 10%.¹

I.1.1 Características e função

As membranas biológicas possuem uma importância muito significativa na estrutura e na função das células, tanto procarióticas como eucarióticas, animais ou vegetais. Considerando a complexidade estrutural, as células procarióticas são células que não apresentam invólucro nuclear, apresentam um número reduzido ou por vezes inexistente de organelos e o material genético encontra-se disperso pelo citoplasma. As células eucarióticas são células mais complexas e que apresentam um maior número de organelos.

Como já referido as membranas biológicas delimitam as células, isto é, a separam o meio extracelular do meio intracelular. Nessa medida estas estruturas evidenciam uma compartimentalização das células.

E através da membrana biológica é que ocorrem muitos dos processos necessários ao bom desenvolvimento celular, como transporte, crescimento, atividade enzimática e resposta imunológica.²

Embora a extraordinária diversidade de células e organitos presentes nos seres vivos, hoje em dia considera-se como sendo a bicamada lipídica a unidade estrutural básica das membranas biológicas.^{1,3}

I.1.2 Breve introdução histórica das membranas

I.1.2.1 Estudos de interface

Ao longo dos anos a membrana biológica tem sido amplamente estudada por diversos cientistas o que proporcionou uma série de modelos descritivos sobre as características e funções das membranas biológicas.

Embora não tendo sido apreciada até ao século XX, o estudo das propriedades física das membranas teve origem em observações de antigos marinheiros que observaram que os óleos flutuavam sobre a superfície da água.⁴

Em tempos mais recentes, mas ainda no século XIII Benjamin Franklin, conhecido estadista Americano e renomeado cientista considerado um dos primeiros descobridores da eletricidade, também elaborou estudo que demonstrava que uma gota de óleo, no caso triolina, em contato com a superfície da água se espalhava e que o mesmo não acontecia em mesas de mármore. Nesse trabalho também ficou verificado que a camada de óleo seria muito fina, muito embora não conseguiu estimar quão fina deveria ser essa camada. Segundo esses cálculos realizados por Franklin, teria sido obtido um valor de 10 Å para a espessura da camada de óleo. Pouco mais de 100 anos mais tarde também Lorde Rayleigh, conhecido vencedor de um prémio nobel em 1904, otimizou a experiência de Franklin e obteve um valor de 16 Å para a camada de óleo. Anos mais tarde em 1917 Irving Langumir, cientista que ganhou um prémio nobel em consequência dos seus estudos sobre a interface entre água/ar, também repetiu os ensaios de Franklin e obteve um tamanho molecular da triolina de 13 Å. Langumir também foi o primeiro a perceber que as moléculas não eram simplesmente esféricas o que o levou a idealizar a forma assimétrica dos surfactantes. Nesse mesmo ano, no Journal of the American Chemical Society ele escreveu um artigo onde demonstra que o ácido oleico em água forma um filme de uma molécula de profundidade, em que a cadeia hidrocarbonada permanece verticalmente na superfície da água com os grupos COOH em contato com a água.

I.1.3 Membrana lipídica. Evolução dos modelos

Atualmente a interpretação estrutural das membranas é baseada na bicamada lipídica.⁴

Em consonância com estudos de interface óleo/água relatados na secção 1.2.1 e a evolução na análise desses sistemas, também os estudos acerca da membrana biológica começaram por essa altura. O primeiro cientista que começou por estudar a membrana plasmática foi um colega de Benjamin Franklin, William Hewson. Os trabalhos de Hewson envolviam estudos microscópicos da forma do eritrócito. Ele reparou que se adicionasse água os eritrócitos mudavam a sua conformação de planar para globular. Isto é, demonstrou com esse estudo a existência de uma membrana plasmática como estrutura envolvente das células, dado o inchaço e a contração por osmose dos eritrócitos.⁴

Outros cientistas ao longo dos anos foram intensificando e otimizando os estudos feitos sobre as membrana biológica obtendo sempre um resultado mais promissor que o anterior. Um desses cientistas foi Charles Ernest Overton, considerado o primeiro membranologista, teve o seu maior contributo para a compreensão das membranas envolvendo estudos de permeabilidade. Também demonstrou que algumas moléculas também permeavam a membrana e que as moléculas neutras permeavam mais rapidamente que as moléculas com carga. No seu trabalho, também encontrou um paralelo entre a permeabilidade de um soluto através da membrana e a sua solubilidade em azeite. Outro aspeto do seu trabalho foi a previsão de que as membranas continham colesterol e fosfatidilcolina (lecitina).⁴

Esses vários estudos levaram a que em 1925 Gorter e Grendel propusessem pela primeira vez por via experimental que as membranas eram bicamadas lipídicas. Isto é, eles propunham que existia uma camada bimolecular de lípidos envolvendo as células. Gorter e Grendel no seu trabalho extraíram os lípidos de uma membrana de eritrócitos com acetona e colocaram-nos à superfície de uma tina com água. Eles observaram que a área dos lípidos estava progressivamente a reduzir-se até se formar um filme unimolecular contínuo. Eles observaram também que área final era o dobro da área de todos os eritrócitos. Em face a esses resultados, eles demonstraram que qualquer organelo celular estava envolto por uma camada de lípidos com duas moléculas de espessura.⁵

Dez anos mais tarde Danielli e Davson generalizaram essas observações sugerindo que a membrana não possuía só lípidos mas que algumas proteínas estariam incorporadas na membrana.

Eles postulavam que as proteínas estariam em contato com a parte polar da bicamada, cobrindo-a dos dois lados. Em meados do século XX, Robertson mostrou que a membrana media 7,5 nm de espessura e que era formada por duas bandas escuras de 2 nm separados por uma banda clara.⁶ Estes resultados foram obtidos após algumas alterações ao modelo para torna-lo compatível com a microscopia eletrónica.

A esse modelo da estrutura da membrana dá-lhe o nome de modelo da membrana unitária.

Durante a década de 60 muitos foram os cientistas que propuseram modelos alternativos para a membrana biológica, mas de todos os modelos apresentados o modelo que até agora perdura como sendo o mais correto é o modelo do Mosaico Fluido, apresentado em 1972 por Singer e Nicholson.

Esse modelo descreve a natureza fluida e dinâmica das membranas biológicas.⁷ Segundo estes dois cientistas, as proteínas seriam icebergs que flutuam num mar lipídico bidimensional e que essas mesmas proteínas difundir-se-iam lateralmente na matriz lipídica, a menos que o seu movimento fosse restringido por associações a outros componentes celulares.⁸

Embora este modelo seja hoje em dia o considerado para a estrutura das membranas há alguns aspetos que na altura estes dois cientistas não consideraram e que nos últimos anos se têm mostrado relevantes. Um desses aspetos prende-se com o eventual papel das estruturas lipídicas não lamelares que se formam espontaneamente em alguns sistemas. Outra característica importante das membranas que não foi contemplada foi a assimetria entre as duas camadas, dado que na altura do estudo não haviam métodos para a caracterizar. Hoje em dia em células animais, a membrana plasmática está bem definida no que se refere à localização preferencial de alguns componentes lipídicos, entre a camada externa e camada citosólica.

Certo é que a visão das membranas tem sido conseqüentemente alterada por associação ao maior conhecimento que se tem desta estrutura.

I.1.4 Lípidos

Das várias estruturas moleculares que é possível encontrar no corpo humano, uma grande parte delas pertencem à classe dos lípidos. Por exemplo na membrana plasmática 50% da sua composição são lípidos, já numa membrana da mielina a percentagem de lípidos ascende a 80%.

Os lípidos exibem uma diversidade de funções biológicas, entre as quais podemos destacar: fonte de energia, estrutura presente na membrana lipídica com ação na delimitação celular, transdução de energia, transportador de eletrões, entre outros

De fato todos estes lípidos apresentam uma função específica sendo que podemos dividir essas funções em três categorias, lípidos estruturais, lípidos de armazenamento e lípidos ativos.

Os lípidos de armazenamento são geralmente não polares e normalmente são encontrados sequestrados em partículas de lípido longe da água. Normalmente não são encontrados nas membranas. Os lípidos ativos são lípidos que possuem uma potencial atividade bioquímica. São encontrados nas membranas mas em muito menor percentagem que os lípidos estruturais. Os lípidos estruturais são os lípidos que formam a matriz da bicamada lipídica e que são o foco deste trabalho.

I 1.4.1 Lípidos da membrana biológica

Uma única membrana pode ter mais de 100 lípidos distintos na sua composição¹. A membrana biológica possui uma grande diversidade de lípidos sendo que os três tipos de lípidos mais abundantes são designados de fosfolípidos, glicolípidos e esteróis.⁷

Os fosfolípidos dividem-se em glicerofosfolípidos ou em esfingofosfolípidos tendo em conta o grupo hidrófobo. Os glicerofosfolípidos são os lípidos mais comuns nas membranas e são derivados do fosfato de glicerol. Os glicerofosfolípidos são moléculas anfipáticas e são compostos por duas cadeias de ácidos gordos muito hidrofóbicos, um grupo glicerol, um grupo fosfato e por uma cabeça polar que pode ser uma colina, uma serina ou uma etanolamina. A estrutura de um glicerofosfolípido apresenta-se com uma cabeça oval composta pelo glicerol, fosfato, e pelo álcool. As duas cadeias acil, são ácidos gordos esterificados ao glicerol.

Na membrana biológica, uma das classes mais importantes são as fosfatidilcolinas, PC's. Embora com grande presença nas células animais nas células procariotas esta classe está num pequena minoria e em muitos casos é inexistente. Já a fosfatidiletanolamina, PE, predominam em bactérias gram negativas e o fosfatidilglicerol, PG, em microplasma. O ácido fosfatídico, PA, apesar de estar em pouca quantidade nas biomembranas é um precursor na síntese de fosfolípidos.

Vulgarmente para se identificar estes fosfolípidos utilizam-se as abreviaturas PC, PE, PG, PA e PS em que a segunda letra refere-se ao grupo ligado ao fosfato. Neste último fosfolípido o grupo polar é a serina.

Consoante a carga do grupo polar, o glicerofosfolípido pode ser zwitteriónico ou carregado negativamente para valores de pH fisiológico. Os glicerofosfolípidos zwitteriónicos são os PC e PE enquanto o PG, PA, e PS são aniónicos.¹

Outro tipo de lípido que é possível encontrar na membrana biológica são os glicolípidos. Os glicolípidos podem conter tanto o glicerol como a esfingosina e têm sempre um açúcar como a glucose no lugar do grupo fosfato encontrado nos fosfolípidos.

Por fim o terceiro mais abundante tipo de lípido que é possível encontrar nas membranas biológicas são os esteróis. Este tipo de lípido está ausente das membranas das bactérias, mas é especialmente importante em membranas de animais (colesterol) e de plantas (fitoesterol). O colesterol é o esteroide mais importante que está presente nas membranas biológicas de seres eucariotas. Este esteroide encontra-se em teores elevados entre 10 a 30%. A estrutura deste componente é diferente dos fosfolípidos e dos glicolípidos. São estruturas tipicamente rígidas e compactas possuindo um grupo hidrofílico, OH enquanto o resto da molécula é hidrofóbica.

Para este trabalho como foi já referido foi estudado a interação da RIF com membranas de POPC e com membranas de POPE:POPC:POPG (50,30,20 % molar). O estudo com a membrana de POPC mimetiza a interação com uma membrana animal, dado ao PC ser o principal fosfolípido deste tipo de membranas biológicas^{1,9}. A interação da RIF com a membrana de mistura ternária mimetiza a interação com uma membrana bacteriana. Sendo que o POPE e POPG são maioritariamente os lípidos principais de uma membrana bacteriana, entre 70 e 20% respetivamente.¹⁰ O PC nestas membranas apresenta-se em muito pouca percentagem.

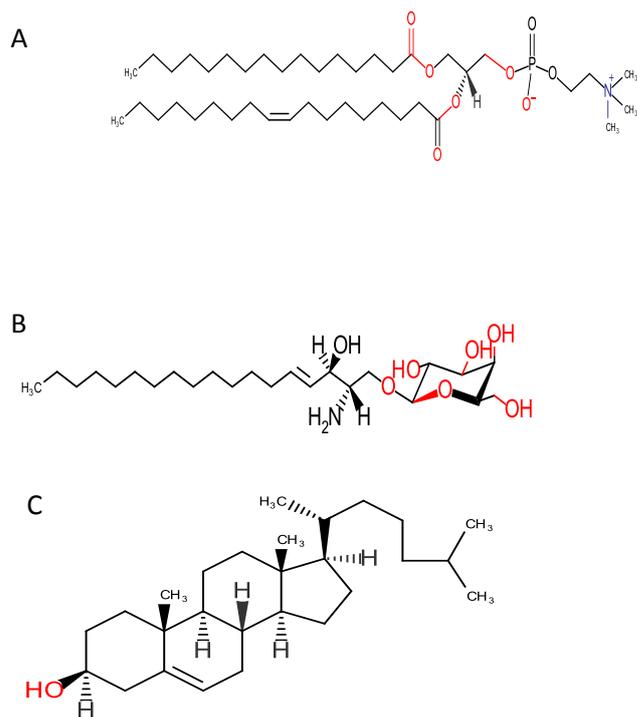


Figura 1: Representação esquemática de três tipos de lípidos encontrados na membrana.
a) Fosfatidilcolina, b) Glicolípido e c) Esterol.

I 1.5 Formação da bicamada lipídica- Efeito hidrofóbico

A estabilidade da rede de ligações de hidrogénio em água torna difícil a dissolução de óleos e derivados de óleo em água líquida.²

Para falar sobre a formação da bicamada lipídica e do efeito que provoca essa estrutura, é necessário dar uma ligeira introdução ao principal responsável por esse fenómeno, a água.

A água é a mais importante das moléculas conhecidas e a que possui propriedades únicas, que nenhuma outra molécula possui. Em termos estruturais a água é uma substância polar e possui uma geometria tetraédrica. Uma das suas principais características é o fato de facilmente formar ligações de hidrogénio consigo mesma e com outras moléculas de água o que leva a que a água consiga existir na forma líquida num intervalo razoável de temperaturas (0-100°C).

A água líquida é um excelente solvente, devido às suas propriedades de polaridade, alta constante dielétrica e pequeno tamanho ela dissolve uma grande parte das

substâncias. Tendo em conta a sua polaridade ela dissolve facilmente compostos polares e iónicos, mas substâncias apolares serão praticamente insolúveis.

Assim, como já referenciado anteriormente a bicamada lipídica é a unidade estrutural das membranas biológicas. E que a sua composição está em grande parte dependente da grande diversidade de fosfolípidos nela presente. É de conhecimento geral que os fosfolípidos são moléculas anfífilas, isto é, possuem uma cabeça polar ou hidrofílica e uma parte apolar ou hidrofóbica.

Estes dois termos hidrofílica e hidrofóbica indicam que a estrutura, no caso o fosfolípido, tem tanto afinidade com o meio aquoso como tem repulsa. E é essa característica que permite que os fosfolípidos se agreguem em bicamadas lipídicas, sendo o efeito hidrofóbico o responsável pela agregação dos fosfolípidos na bicamada lipídica.

Mas o que é o efeito hidrofóbico? O efeito hidrofóbico é a tendência de moléculas apolares, ou partes de moléculas, a associarem-se preferencialmente entre si quando estão num ambiente aquoso.¹¹ Esse arranjo molecular permite a eliminação de contatos desfavoráveis entre o meio aquoso e as cadeiras hidrofóbicas, permitindo ao mesmo tempo a solvatação das cabeças polares.⁸ Este tipo de agregado formado está dependente não só do efeito hidrofóbico como também de outros parâmetros, como é o caso de forças Van der Waals nas cadeiras hidrocarbonadas e ligações de hidrogénio na cabeça polar dos fosfolípidos. Sendo por isso um efeito principalmente de natureza entrópica.

Assim sendo, o efeito hidrofóbico é a principal força motriz para toda a estrutura biológica, incluindo a das membranas.⁴

I.1.6 Formação de lipossomas

Como referido anteriormente, os lípidos quando em solução aquosa têm tendência a agregar-se, induzidos pelo efeito hidrofóbico. Evitando o contato desfavorável da região apolar com a água, reduzindo a energia livre de Gibbs.

A agregação dos fosfolípidos acontece assim acima de uma determinada concentração, designada de concentração de agregação crítica.

Um fosfolípido tanto pode agregar-se e formar uma bicamada lipídica, como também pode agregar-se e formar micelas. A preferência para formar micelas ou uma bicamada está dependente do parâmetro crítico de empacotamento. Este parâmetro é dado pela seguinte expressão $p = \frac{v}{a_0 t_c}$, onde a_0 é a área da secção de corte na zona polar

perpendicular ao eixo da molécula, V o volume da anfífila e l_c é a distância crítica da anfífila ao longo da interface agregado/solução aquosa.³

Quando $p = \frac{1}{3}$, ocorre a formação de micelas esféricas, quando $p = \frac{1}{2}$, ocorre a formação de micelas cilíndricas e quando $p = 1$, ocorre a formação da bicamada lipídica.^{12,13} Este parâmetro em alguns casos pode ser maior que 1, como apresentado de seguida.

Dadas as estruturas dos 3 fosfolípidos apresentadas em baixo é possível identificar várias diferenças e no que toca ao fator de empacotamento crítico essas diferenças levam a que a geometria de fase da molécula seja diferente.

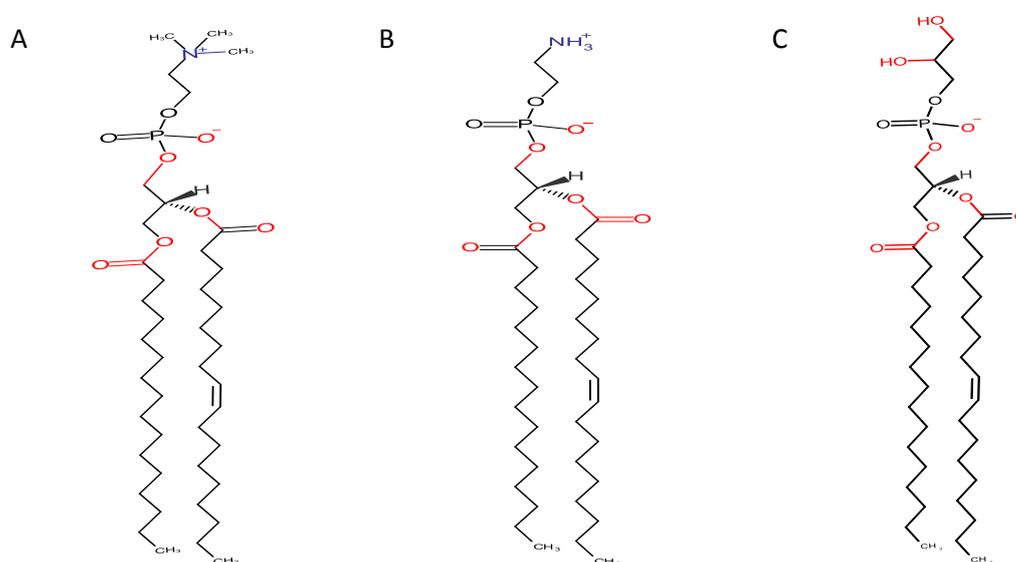


Figura 2: Estrutura molécula de diferentes glicerofosfolípidos. A – POPC, B – POPE, C - POPG.

Tendo em conta já referido em cima e analisando as estruturas dos 3 fosfolípidos podemos enunciar algumas considerações que nos permite compreender os resultados obtidos neste trabalho.

Tendo em conta os 3 fosfolípidos usados neste trabalho, podemos identificar que as únicas diferenças estruturais dos mesmos identificam-se no grupo polar.

As diferenças nas cabeças polares dos fosfolípidos vão provocar diferenças na partição da RIF para as membranas.

Analisando cada um dos fosfolípidos é possível observar que o grupo polar do POPE em comparação com o grupo polar do POPC possui uma área de secção transversal mais pequena. A razão para essa diminuição prende-se com a amina primária mais

pequena presente no PE e a amina terciária presente no PC.¹⁴ A essa diminuição da área de secção transversal mais pequena no PE leva a uma maior ordem da cadeia hidrocarbonada,¹⁵ que origina uma temperatura de transição maior para o POPE, 25¹⁶ do que os -2 °C¹⁷ para o PC.

A área de secção transversal do PE é menor em relação ao PC originado pelo fato de a amina primária ser mais pequena que a amina terciária e o menor número de ligações com moléculas de água, que resulta em ligações de hidrogénio dessa amina com grupos fosfato e carbonilos, grupos aceitadores, de PE's adjacentes. Estas ligações intermoleculares de hidrogénio, substituem ligações de hidrogénio entre o PE e a água, que por conseguinte reforça significativamente o contanto entre lípidos.¹⁴ Assim, a diferença entre bicamadas de PE e PC está intimamente ligado às ligações de hidrogénio intermoleculares presentes em bicamadas de PE, mas ausentes das bicamadas de PC.

Estas diferenças enunciadas quanto à área da secção transversal e às ligações de hidrogénio formadas levam a que sob um grande intervalo de temperaturas o PC é encontrado preferencialmente, em membranas biológicas, sob a forma de bicamadas lamelares, tendo um fator de empacotamento crítico está entre ½ e 1. Enquanto o PE é encontrado ou em fases lamelares ou em fases hexagonais, dependendo da composição das cadeias apolares,¹⁸ devido à menor área da cabeça polar em relação às cadeias apolares. Para as PE's o fator de empacotamento crítico é >1.¹

Em termos de interações electroestáticas o movimento da cabeça polar hidratada de bicamadas de PC é maior que as bicamadas hidratadas do PE, sendo que o grupo polar é maior no PC do que no PE, como já vimos, e a carga positiva do PE está mais localizada no plano da bicamada.¹⁸

No que diz respeito ao outro fosfolípido utilizado neste trabalho, o POPG, este possui um grupo polar completamente diferente dos outros dois fosfolípidos. Enquanto os POPE e POPC possuem aminas no seu grupo polar o POPG possui um grupo glicerol, como mostra a figura em cima.

Da mesma forma que a amina primária tem potencial para fazer ligações de hidrogénio intermoleculares por ser um grupo dador, também o grupo hidroxilo do PG tem essa capacidade. Embora ligações com outros PG's praticamente não ocorrem, uma vez que como possui uma carga negativa esta leva a um enfraquecimento das interações inter-lipídicas via ligação de hidrogénio, devido à repulsão electroestática provocada por essa carga.¹⁶ Outro aspeto em relação ao PG é a maior ordem das cadeias em relação ao PC, verificado através de dinâmica molecular.

O PG é então um lípido aniônico encontrado nas membranas de mamíferos em muito pequena quantidade, cerca de 1 a 2% do total dos fosfolípidos. Embora não sendo um lípido com grande presença na bicamada lipídica é um dos principais lípidos no surfactante pulmonar⁴. Por contraste com a presença em membranas animais pode ser um dos lípidos mais abundantes das membranas de algumas bactérias e de algumas plantas.⁴ Possui uma $T_M = -2^\circ\text{C}$.¹⁹

Todos os 3 fosfolípidos possuem um pKa de 2,1 no grupo hidroxilo ligado ao fosfato.⁴

Qualquer bicamada em excesso em água, dependendo da temperatura, pode-se encontrar em dois tipos de fases, na fase gel menos fluída ou na fase líquida mais fluída.²⁰ Neste trabalho dadas as temperaturas de fase enunciadas em cima e dada que a temperatura das amostras lipídicas ao longo do trabalho foi de 25°C , o POPC e o POPG encontram-se na fase líquida e o POPE encontra-se entre a fase gel e a fase líquida.

Assim dadas as composições lipídicas dos vários LUV's preparados ao longo do trabalho, identificamos que os LUV's compostos por POPC encontram-se na fase líquida, mais fluída. Nesta fase as cadeias acilo do PC são caracterizadas por uma conformação trans-gauche baixa. Já nos LUV's compostos pela mistura lipídica ternária dadas as diferenças verificadas nas fases dos diferentes fosfolípidos e tendo em conta a proporção de cada um deles, é provável que nesta mistura lipídica a fase esteja mais próxima da fase gel do que da fase fluída. Na fase gel os lípidos apresentam uma razão conformacional trans/gauche elevada, o que leva às cadeias acilo ficarem completamente distendidas ficando perpendiculares ao plano da membrana. Neste tipo de fase as bicamadas são caracterizadas por um elevado grau conformacional, rotacional e translacional.

Na figura 3 apresentam-se as diferentes fases que uma membrana pode encontrar.

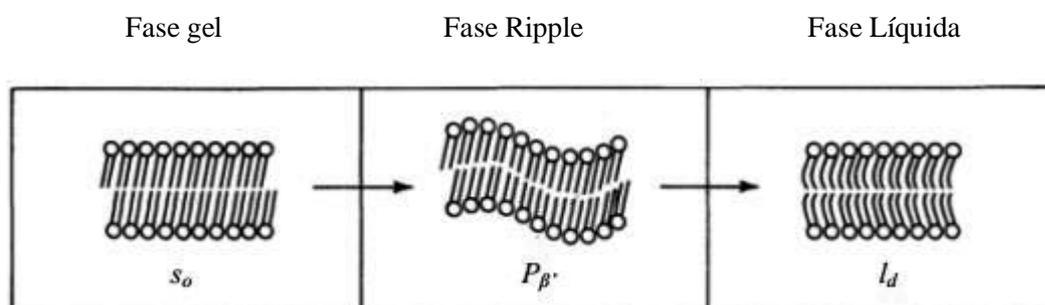


Figura 3: Representação dos diferentes tipos de fases que as membranas podem apresentar. Adaptação de Gennis, 1988.²¹

I.1.6.1 Lipossomas

Os lipossomas são vesículas que possuem uma bicamada concêntrica de fosfolípidos.²² As estruturas lipídicas podem ser classificadas de acordo com o número de bicamadas e com o seu diâmetro. Assim podemos ter vesículas unilamelares pequenas ou largas (SUV e LUV), vesículas multilamelares (MLV) e vesículas multivesiculares (MVV).²³ As vesículas multilamelares largas (MLV's), possuem um intervalo tamanho entre os 500 a 10,000nm. Apesar de serem facilmente preparadas, mas tendo em conta a sua elevada multilameralidade, estas estruturas não possuem propriedades vantajosas para estudos fotofísicos, devido à elevada dispersão de luz.¹

As vesículas unilamelares pequenas, com diâmetro inferior a 50nm, são designadas por (SUV's), se tiverem diâmetros superiores a 50nm são as vesículas unilamelares grandes (LUV's) e se possuírem um diâmetro no intervalo de 10000 a 100000 são designadas de vesículas unilamelares gigante (GUV's).²²

Neste trabalho os lipossomas utilizados foram os LUV's, vesículas unilamelares grandes, com um diâmetro de 100 nm.

Dos vários métodos existentes para a produção de LUV's, neste trabalho foi utilizado o método do filme lipídico, com o auxílio de um processo de *freeze and thaw* seguindo de uma extrusão sob fluxo de N₂ através de membranas com poros de 100nm de diâmetro num total de 13 passagens.

As vantagens desta técnica incluem a ausência de solventes orgânicos e detergentes, a alta concentração de lípido que pode ser aplicada e alta eficiência de encapsulação.²⁴

Os lipossomas são comumente usados como modelo biológico das membranas celulares em estudos de morfologia, interação membrana soluto e outros processos relacionados com a membrana.²⁵ Para este trabalho uma vez que o seu propósito foi o estudo da interação de um ligando com a membrana biológica, a forma mais reprodutível desse sistema são os LUV's com os lípidos alvo.

I.2 Interação de anfífilas com a bicamada lipídica

Atualmente, a membrana biológica das células e em particular a suas bicamadas lipídicas tem recebido uma considerável.²⁶

A interação de moléculas anfífilas com proteínas e biomembranas é uma propriedade chave que determina a biodisponibilidade e a velocidade a qual elas atingem o local ativo na célula do organismo.²⁷ Para estudos de permeação passiva através das membranas, os modelos mais comuns assumem que o passo limitante é a difusão através a membrana, translocação no caso de moléculas anfífilas, e que a partição entre os meios aquosos e cada camada da bicamada lipídica pode ser determinado no equilíbrio.

A permeação através da membrana é um pré-requisito para um soluto chegar ao alvo intracelular e que para além disso determina a farmacocinética e toxicocinética desse mesmo soluto. Por isso a permeação com da membrana biológica é a principal rota para a passagem de fármacos pela membrana.²⁸

Estudos desenvolvidos no grupo de Processos Químicos e Biológicos, grupo no qual eu me insiro, têm ao longo dos últimos anos estudado a interação de pequenas moléculas como a CPZ e o SDS através da bicamada lipídica. Em alguns desses estudos o foco é essencialmente o transporte passivo de moléculas através da barreira sangue-cérebro. Como mais em baixo vou relatar mais em baixo, é uma barreira que é sensivelmente mais complexa do que uma barreira, bicamada lipídica, de qualquer uma das células do organismo.

A constante de permeação através da bicamada lipídica é um dos parâmetros mais importantes para avaliar a farmacocinética de determinado fármaco. Esse parâmetro é importante na medida em que é um dos parâmetros que permite avaliar a eficiência de determinado tratamento tendo em conta o fármaco utilizado.

Para efetuar um estudo de partição de uma molécula para uma membrana é necessário considerar um modelo de partição. Uma maneira de ilustrar o particionamento membrana-água é traçando uma partição isotérmica mostrando a fração molar do soluto na membrana como função da concentração do soluto na fase aquosa, que está em equilíbrio com a membrana a uma dada temperatura.²⁹

Neste trabalho foi considerado um modelo de partição simples. Tendo em conta o modelo de partição simples, descrito em seguida, os parâmetros mais relevantes são a

concentração de ligando na fase aquosa e o coeficiente de partição pela da bicamada lipídica.

$$RIF_W \xleftrightarrow{Kp^{obs}} RIF_L$$

As técnicas que se podem usar para determinar a partição de uma anfifíla pela bicamada lipídica, para além do ITC, são a espectroscopia de absorção UV/Visível ou a espectroscopia de fluorescência. Estas técnicas permitem obter para além da constante de partição a concentração do ligando em cada uma das fases em questão, aquosa e lipídica.

Neste trabalho o foco principal para a determinação do coeficiente de partição foi através da calorimetria de titulação isotérmica, muito embora um ensaio preliminar foi elaborado por espectroscopia de UV/Visível.

I.3 Rifampicina

A rifampicina é uma molécula inodora, de pó cristalino, de coloração avermelhada e com um peso molecular de 822,95 g/mol. A representação da RIF está apresentada em baixo.

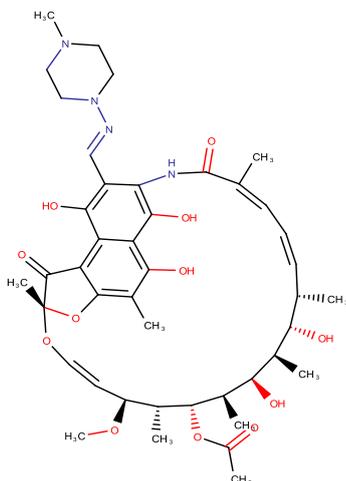


Figura 4: Estrutura da RIF.

I.3.1 Propriedades físicas e químicas

A RIF apresenta um espectro de absorção na região UV/Visível com diferentes absorptividades molares para diferentes comprimentos de onda. Na tabela 1 estão apresentados esses valores de absorptividades molares para diferentes comprimentos de onda, obtidos em tampão fosfato a pH 7,38.³⁰

Tabela1: Valores das absorptividades molares da RIF a diferentes comprimentos de onda

$\lambda_{\text{máx}}$, nm	$\epsilon \text{ M}^{-1}$ cm^{-1}
237	33200
255	32100
334	27000
475	15400

A RIF possui uma temperatura de fusão no intervalo de 183-188°C,³¹ é solúvel em água, aproximadamente 1mM, é francamente solúvel em clorofórmio e é solúvel em solventes como metanol, etil acetato e dimetil sulfoxido.³⁰

As propriedades de ionização da RIF foram obtidas por a espectroscopia de absorção UV/Visível. Apresenta pKa de 1,7³⁰ para os grupos hidroxilo e 7,9³⁰ para o grupo piperazina. A RIF em solução aquosa é zwitteriônica e apresenta um ponto isoelétrico de 4,8.³⁰

A RIF é um antibiótico semi-sintético com atividade bactericida contra grande parte das bactérias gram positivas e gram negativas.³² O principal uso da RIF é no tratamento de doenças como a tuberculose e a lepra, em associação com outros fármacos antibacterianos.

I.3.2 Estabilidade

Desde que foi pela primeira vez isolada em Itália em 1957 que a RIF tem sido alvo de vários estudos acerca da sua estabilidade tendo em conta o ambiente em que se

encontra, de modo a se poder perceber como é que esta se comporta nas imediações desses meios.

Como já indiquei em cima, a RIF é levemente solúvel em água e solúvel em metanol ou clorofórmio. Em meios alcalinos, entre pH 7,5 e 9,0 a RIF sofre degradação oxidativa na presença de oxigénio e à temperatura ambiente, formando a rifampicina-quinona.³³ Em meio ácido, meio encontrado no estômago, a RIF fica sujeita à catálise ácida e conseqüentemente sofre hidrólise dando origem a 3-formil rifamicina e 1-amino 4-metil piperazina.

Tendo em conta essa degradação no estômago a sua biodisponibilidade vai aumentar para valores de pH mais acídicos.

1.3.3 Propriedades farmacocinéticas da RIF

Para garantir o sucesso de um determinado medicamento é necessário que esse medicamento tenha boa biodisponibilidade e um tempo de meia vida biológica longo.³⁴

A biodisponibilidade oral de um medicamento é determinada tendo em conta a fração com que esse medicamento chega à corrente sanguínea. O tempo de meia vida biológica sugere o tempo necessário para que metade da substância seja removida do organismo.

Na ação de um medicamento sobre a célula alvo o medicamento passa por 4 fases distintas a que se dá o acrónimo de ADME, (absorção, distribuição, metabolismo e excreção). Uma boa estimativa e compreensão destes parâmetros farmacocinéticos, permite perceber como é que o medicamento irá se comportar uma vez dentro do organismo.

A absorção, primeira fase por que passa um medicamento, pode ser influenciada por vários fatores, dentre os mais importantes a lipofilicidade, capacidade que um composto tem de se dissolver em gorduras, lípidos e a solubilidade que é a quantidade máxima que uma substância pode dissolver num líquido. Se a substância que se pretende utilizar como medicamento não for lipofílica ou solúvel é logo um entrave sério ao desenvolvimento de um medicamento contendo aquela substância. Podendo ser explicado a importância desses dois fatores, pelo fato que a membrana das células epiteliais gastrointestinais, bem como todas as outras membranas celulares, são compostas por uma bicamada lipídica onde por entre os fosfolípidos podemos também encontrar proteínas³⁴.

E além do mais, grande parte do corpo humano e sobretudo o meio intercelular é um meio aquoso.

No caso da Rifampicina, o meio acidificado do estômago favorece mais a sua absorção, devido a tornar-se mais polar. Estudos elaborados mostram que a absorção da Rifampicina no estômago é mais eficaz quando o estômago está vazio³⁵. Após a administração oral da Rifampicina a concentração no plasma é máxima entre 1,5 a 3 horas para uma vasta gama de concentração numa única dose 0, 1 a 1,2 g³⁰.

A segunda fase do processo é a distribuição no organismo, sendo descrita pela transferência reversível da substância de um local para outro. Uma vez na circulação sistêmica, o medicamento é distribuído entre os fluidos intersticiais e intracelulares, podendo cada órgão receber quantidades diferentes da substância com diferentes períodos de presença desta.

Nesta fase também a lipofilicidade da substância é um fator importante, uma vez que permite que a substância circule quase livremente pelos vários tecidos. Assim quanto maior a lipofilicidade da substância maior será a sua distribuição pelos tecidos.³⁶ Outros fatores que influenciam a distribuição prendem-se com o tamanho molecular, a polaridade e a ligação a proteínas do soro.

Dos vários tecidos presentes no organismo o cérebro é em muitos aspetos diferente da maioria dos órgãos, sendo que uma das principais características é a completa separação do cérebro e do sangue pela barreira hémato-encefálica. Enquanto todos os órgãos têm capilares revestidos com células endoteliais com pequenos poros entre as células para permitir a livre circulação do medicamento da corrente sanguínea para o fluido intersticial, no cérebro esses poros nos capilares endoteliais não existem o que leva a substância a entrar no cérebro por difusão simples.

A distribuição da Rifampicina pelos diversos tecidos foi avaliada em células removidas cirurgicamente após a administração de doses de 150 e 450 mg. Foi recolhido sangue de forma a estabelecer um rácio entre a concentração da RIF em tecido e no sangue e os resultados demonstraram que para as doses de 450 mg, após um intervalo de tempo de 12 horas da administração do fármaco, os órgãos como a bÍlis, o fÍgado, a parede da vesícula biliar, a uretra e a parede do cisto ovárico apresentavam um rácio menor que 1. Uns rácios na ordem de 1 foram encontrados em tecidos como o baço, o apêndice, a pele e os músculos. E rácios maiores que 1 foram encontrados em tecidos como os pulmões e a parede do estômago.^{35,37} Após a distribuição tem-se o metabolismo do fármaco.

Na conceção de novos fármacos ter conhecimento sobre o metabolismo humano desse novo fármaco é fundamental na previsão de potenciais interações entre o fármaco, bem como selecionar as espécies animais para os estudos de toxicidade.³⁴

O metabolismo é a fase em que o fármaco após ser absorvido e distribuído pelos vários tecidos é então metabolizado dando origem a outros compostos, chamados de metabolitos. Esses metabolitos podem ser farmacologicamente inertes ou ativos. Quando inertes o metabolismo desativa a dose administrada do fármaco original e reduz assim o efeito deste no organismo, quando ativo os metabolitos podem coincidir ou ser mais ativos que o fármaco original.

O principal derivado ou metabolito formado pelo metabolismo da RIF no homem é a desacetilrifampicina, que é farmacologicamente ativo, muito embora menos ativo que a RIF.³⁸ A transformação da RIF na desacetilrifampicina ocorre no hepatócito e resulta num composto mais polar que facilita a sua excreção através da urina.

Por fim a última fase de um fármaco no organismo é a sua excreção. A remoção dessa nutriente pode ocorrer segundo duas vias excretoras. Ou pelos rins e é excretada como urina ou pela vesícula biliar, processo que é iniciado no fígado, passa pelo trato gastrointestinal e é excretada como fezes.

No caso particular da RIF o tempo de eliminação é lento e a via preferencial é pela biliar embora haja alguma eliminação pela urina. Resultados mostram que a excreção pela urina aumenta com o aumento da dose e que através da biliar essa eliminação não é proporcional à dose ingerida.

I.3.4 RIF, mecanismo de ação

A RIF é um dos antibióticos mais potentes e de mais largo espectro contra patógenos bacterianos e é um componente chave na terapia anti tuberculose, decorrente da inibição da RNA polimerase bacterial.³⁹

Como já indiquei nas propriedades farmacocinéticas a RIF difunde livremente pelos tecidos, pelas células vivas e bactérias, sendo extremamente eficaz contra patógenos com a *M-Tuberculosis*, bactéria promotora da doença da tuberculose.⁴⁰

Estudo feitos ao longo dos anos sobre o mecanismo estrutural de inibição da RNA polimerase pela RIF foram dando conclusões que tanto para células de *E.coli* como para células de *Thermus aquaticus* e para as células da bactéria *M. tuberculosis* o efeito da RIF

era semelhante. Analisando as interações da RIF-RNA polimerase das várias bactérias, estas indicavam que comparando regiões distintas do gene que codifica a subunidade RNAP, o *rpoB* mostravam altos níveis de conservação nos três tipos de bactérias.

Capítulo II

Material e Métodos

II.1 Materiais

Neste capítulo será apresentado os reagentes e os equipamentos utilizados para a realização deste trabalho.

II.1.1 Reagente

- Trizma – Sigma, Cas 775-86-1, Lote 1699
- Hepes – Sigma, Cas 7365-45-9, Lote 1408
- Fosfato de sódio dibásico – Sigma, Cas 7558-79-4, Lote 1192
- EDTA- General Purpose Reagent, Prod 28921, Lote 1361
- Azida de sódio – Fluka, Lote 419515/1
- Cloreto de sódio – Sigma, Cas 7647-14-5, Lote 1636
- Acido Perclórico (70%) – Sigma, Cas 7601-90-3
- Acido Ascórbico – Sigma, Cas 50-81-7
- Molibdato de Amónio – BDH, Prod number 27187, Lote 1107
- Metanol (99,9%) – Sigma, Cas 57-56-1
- Clorofórmio – Sigma, Cas 67-66-3
- Cromossulfúrica – Riedel-de-Haen, Lote 60810
- Rifampicina – Parafarm, Lote 107012
- POPC – Avanti Polar Lipids, Cas 26853-31-6
- POPE – Avanti Polar Lipids , Lot 100PE-15
- POPG – Avanti Polar Lipids, Cas 268550-95-4

II.1.2 Soluções Tampão

Uma solução tampão é uma solução capaz de atenuar alterações de pH do meio que está a hidratar. Para este trabalho, foi necessário utilizar soluções tampão para atenuar possíveis diferenças de pH e garantir um grau de equilíbrio.

Neste trabalho as soluções tampão utilizadas foram as seguintes:

- Solução tampão TRIZMA, preparada através da mistura de Trizma (10mM), azida de sódio (0,02% m/v), EDTA (1mM) e cloreto de sódio (150mM). O pH foi ajustado a 7,4 com hidróxido de sódio e/ou ácido clorídrico.
- Solução tampão TRIZMA, preparada através da mistura de Trizma (10mM), azida de sódio (0,02% m/v), EDTA (1mM). O pH foi ajustado a 7,4 com hidróxido de sódio e/ou ácido clorídrico.
- Solução tampão HEPES, preparada através da mistura de Hepes (10mM), azida de sódio (0,02% m/v), EDTA (1mM) e cloreto de sódio (150mM).
- Solução tampão de FOSFATO, preparada através da mistura de fosfato de sódio dibásico (10mM), de azida de sódio (0,02% m/v), EDTA (1mM) e cloreto de sódio (150mM).

O pH dos diferentes tampões foram ajustados a pH=7,4 através do medidor de pH Jenway 3510.

II.1.3 Equipamento

- Extrusor Lipex Biomembranes;
- Medidor de pH Jenway 3510;
- Espetrofotômetro UV/Vísivel Spectronic Unicam UV 500;
- Fluorímetro Varian Cary Eclipse com banho de Peltier.
- Stopped flow – HiTech Scientific
- ITC - MicroCal™ VP-ITC

II.2 Métodos

De seguida será indicado o tipo de métodos utilizados ao longo deste trabalho.

II.2.1 Preparação de LUV's por extrusão

Para que haja uma representação fidedigna das bicamadas lipídicas, foi necessário recorrer à técnica de extrusão para se poder obter os LUV's a fim de ser objetivo de estudo.

Foram preparadas previamente soluções de stock dos lípidos de interesse, que neste trabalho foram de POPC, e POPE e POPG, numa mistura azeotrópica de Clorofórmio:Metanol (87:13 (v/v)), as soluções stock foram guardadas no congelador a -20°C.

Recorrendo às soluções stock de lípido em solução azeotrópica retirou-se o volume necessário de acordo com a concentração e volume final desejados. Após um tempo de equilíbrio que varia de acordo com o número de componentes, 15 minutos por componente adicional, o solvente foi evaporado sob a incidência de um fluxo de ar quente na parte externa do tubo da enquanto o tubo é mantido sob agitação constante por intermédio de um vortéx e sob um fluxo de azoto. Após este processo de evaporação do solvente o filme é colocado no exsiccador sob vácuo entre 5 a 16 horas.

O filme é posteriormente hidratado com a solução tampão a pH 7,4 necessária ao estudo e colocado num banho a uma temperatura de 10°C acima da temperatura de transição de fase do lípido ou da mistura lipídica, tornando a bicamada mais fluida facilitando assim a hidratação.

Após a hidratação a solução é agitada de forma a suspender todo o filme de lípido presente no tubo e obtendo-se uma suspensão de vesículas multilamelares, que irão ser sujeitas a um processo de extrusão através de dois filtros de policarbonato com 100nm de poro para obtenção de LUV'S.

Antes de se colocar a solução de lípido no extrusor, procedeu-se ao *freeze and thaw* da mistura de lípido por 3 vezes. Após os três passos de *freeze and thaw* a amostra é colocada no extrusor e após cada uma das três primeiras passagens da amostra no extrusor é realizado um passo de *freeze and thawn*. Após isso, a amostra passa pelo extrusor por mais 10 vezes.

Durante este trabalho foram preparadas soluções de lípido de POPC puro e uma mistura lipídica com os seguintes lípidos PE:PC:PG na proporção de (50:30:20 mol%).

II.2.2 Análise da concentração de lípido

Durante o processo de obtenção de vesículas unilamelares é normal perder-se algum do lípido previamente preparado. Assim de forma a saber qual a concentração exata de lípido é necessário recorrer à quantificação do lípido, tendo em conta o método de quantificação de fosfatos descrito por Barlett.⁴¹ Este método baseia-se na análise de fosfato através da redução do fosfomolibdato formando um complexo de cor azulada que absorve a um comprimento de onda de 700nm. Recorreu-se assim a uma reta de calibração a fim de obter-se as concentrações das amostras lipídicas.

Para a quantificação dos fosfatos presentes nas amostras é necessário primeiramente preparar três soluções stock, uma solução de K_2HPO_4 1mM (solução A), uma solução de molibdato de amónio 1% w/v (solução B) e uma solução de ácido ascórbico 4% w/v (solução C).

Para a reta de calibração é necessário pipetar os seguintes volumes da solução A, 0.0, 100, 150, 200 e 300 μ L, para um tubo de 20mL. Das soluções de LUV's para quantificar é retirado um volume necessário para os tubos de 20mL para que a concentração se encontre a meio da curva de calibração. Uma vez que o volume total em cada tubo terá que ser 300 μ L, perfaz-se o volume restante com água.

De seguida com uma pipeta de vidro adiciona-se a cada tubo 700 μ L de ácido perclórico 70% e homogeneizam-se as soluções levando-as à agitação no vortéx. Com berlindes de vidro em cima de cada tubo, estes são levados a um banho seco a 190°C até um máximo de duas horas.

Após o arrefecimento à temperatura ambiente, acrescenta-se 2mL da solução B e 2mL da solução C. As soluções voltam a ser agitadas no vortéx e incubadas a 37°C entre 1 e 2 horas.

A absorvância de cada tubo é lida no comprimento de onda de 700nm através da espectroscopia UV/Vis e a concentração de cada um dos tubos é dada pela equação obtida pela reta de calibração.

II.2.3 Calorimetria de titulação isotérmica

A calorimetria mede diretamente o calor associado a um dado processo, o que a pressão constante, é igual à variação da entalpia do processo, ΔH .⁴²

A calorimetria de titulação isotérmica, (ITC), é uma técnica analítica versátil que se tornou numas das técnicas mais importantes na caracterização de interações moleculares.⁴³

A caracterização de interações moleculares por parte desta técnica é feita através da medida exata do calor absorvido ou gerado um processo sequencial de ligação, ou seja, uma titulação.

Ao contrário de outras técnicas, o ITC permite determinar simultaneamente a afinidade de ligação e a entalpia de ligação, fornecendo uma caracterização termodinâmica completa da ligação do ligando numa só experiência.⁴⁴

As aplicações mais comuns deste tipo de equipamento de calorimetria são as interações entre: proteínas-ligando; enzima-inibidor; proteína-proteína, proteína-DNA; proteína-lípido e proteína-açúcares.

Para interações do primeiro tipo enunciado, proteínas-ligando, as vantagens perante outras técnicas de caracterização de interações são as seguintes. As condições experimentais não são alteradas e por conseguinte, os resultados obtidos são determinados nas condições estabelecidas, a estabilidade cinética ou termodinâmica da macromolécula não é comprometida pela mudança das condições experimentais e a extrapolação através de equações para outros valores de temperatura ou pH não são necessários.

Em termos de desvantagens, é necessário que a solução a titular e a titulante sejam solúveis na mesma solução tampão.

Outro tipo de aplicação, em menor escala, mas que foi o principal deste trabalho, é a caracterização da interação lípido-ligando.

Para este tipo de interação embora não se obtenha constante de afinidade ou dissociação, uma vez que o lípido não tem sítios de ligação específicos como é o caso das proteínas mas sim vários, é possível obter-se as constantes de partição e entalpias de partição tendo em conta modelos matemáticos que caracterizam estas interações.

O ITC funciona tendo em conta a potência diferencial medida entre a célula de referência e a célula de análise necessária para que a diferença de temperatura entre as células se mantenha próxima de zero. Ou seja, numa reação exotérmica a potência diminui sendo necessário por isso equilibrar/variar a potência fornecida para que esta seja zero. No processo endotérmico o contrário é o esperado.

Procedimento experimental

As titulações foram realizadas utilizando o equipamento do *MicroCal*TM VP-ITC, com um volume de 1436µL, a 25°C. A velocidade de rotação foi 459 rpm e a potência de referência foi 10 µcal s⁻¹. A titulação procedeu-se com adições de 10µL.

Todas as amostras tituladas foram desgasificadas, durante um tempo máximo de 10 min a fim de tornar as amostras livres de bolhas de ar. As amostras de lípido foram colocadas na seringa e as amostras de RIF na célula, uma titulação normal. Na titulação inversa o lípido é colocado na célula e a RIF na seringa.

Foram realizados dois tipos de protocolos: i) *uptake*, onde os lipossomas são injetados na RIF presente na célula e ii) *release*, onde uma solução de lipossomas contendo RIF foi injetada num solução de tampão na célula. O principal objetivo destes protocolos foi obter parâmetros termodinâmicos para a reação, bem como avaliar qualitativamente a constante de velocidade de translocação.⁴⁵

Os termogramas obtidos foram integrados usando o *software* de análise de dados *Origin 7.0* modificado pela *Microcal* para lidar com experiências de ITC. E as curvas da titulação foram ajustadas com equações apropriadas no Microsoft Excel com a ferramenta Solver.

Para estes ensaios, o calor previsto envolvido $q(i)$ no passo (i) da titulação foi calculado segundo a equação 1 e o melhor ajuste do modelo para os valores experimentais foi obtido segundo os mínimos quadrados entre o calor previsto e o obtido por injeção para todos os passos da titulação.

$$q(i) = \Delta H \left(n_{\text{RIF}_L}(i) - n_{\text{RIF}_L}(i-1) \left(1 - \frac{V(i)}{V_{\text{cell}}} \right) \right) + q_{\text{dil}} \quad (1)$$

Onde $V(i)$ é o volume de injeção, $V(\text{cell})$ é o volume da célula calorimétrica, q_{dil} é o calor de diluição e $n_{\text{RIF}_L}(i)$ refere-se ao número de moles de RIF na fase lipídica por injeção.

A constante de partição é assim determinada tendo em conta a presença de determinado soluto entre duas fases. Isto é, neste caso a constante de partição foi obtida tendo em conta o número de moles de RIF na fase aquosa, (RIF_W) e o número de moles de RIF na fase lipídica, (RIF_L).

O coeficiente de partição é dado então pelo rácio de concentrações de RIF em cada uma das fases calculado tendo em conta o volume da respetiva fase.

$$K_P^{obs} = \frac{n_{RIF_L}/V_L}{n_{RIF_W}/V_W} = \frac{n_{RIF_L}/([L]\tilde{V}_L V_T)}{n_{RIF_W}/V_T} \quad (2)$$

$$n_{RIF_L} = n_{RIF_T} \frac{K_P^{obs} [L] \tilde{V}_L \gamma}{1 + K_P^{obs} [L] \tilde{V}_L \gamma} \quad (3)$$

Onde n_{RIF_T} é o número de moles de RIF total, n_{RIF_W} é o número de moles de RIF na fase aquosa e n_{RIF_L} é o número de moles de RIF na fase lipídica. O V_T , o V_w e o V_L são o volume total volume molar da fase aquosa e da fase lipídica, respetivamente. O volume molar usado para os lípidos foi de $V_L = 0,756 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$,⁴⁶ o $V_w = 1436 \text{ }\mu\text{L}$.

Para os estudos de translocação e inserção/desorção, foi necessário considerar a concentração efetiva de RIF. A concentração de RIF pode não estar necessariamente distribuída da mesma forma pelas duas monocamadas, interna e externa. Então para este estudo foi necessário recorrer à concentração de lípido acessível à RIF. De acordo com as equações 4 e 5, depende do valor de gama (γ). Este valor determina qual a fração de lípido acessível à RIF.

$$[L]^*(i) = [L]^*(i-1) \left\{ 1 - \frac{V(i)}{V_{cell}} \right\} + \gamma \left\{ [L]^{Syr} \frac{V(i)}{V_{cell}} \right\} \quad (4)$$

$$n^*_{RIF_T}(i) = n^*_{RIF_T}(i-1) \left\{ 1 - \frac{V(i)}{V_{cell}} \right\} + \left\{ \gamma [RIF]_L^{Syr} + \gamma [RIF]_W^{Syr} \right\} V(i) \quad (5)$$

Onde (i) refere-se ao número da injeção, o índice Syr refere-se à concentração na seringa os sub-índices W e L referem-se às fases onde a RIF está presente, L para lípido e W para água.

Através dos protocolos *uptake* e *release*, que mais à frente descrevo, é possível obter a cinética de translocação da RIF nas bicamadas lipídicas.

II.2.3.1 Correção ao efeito electrostático

Tendo em conta os $pK_a = 1,7$ para os grupos hidroxilo dos anéis aromáticos e 7,9 do grupo piperazina, a pH 7,4 a RIF torna-se negativa quando associada a membranas de POPC. Este resultado será apresentado mais à frente quando apresentar os resultados da entalpia de ionização da RIF em diferentes tampões.

Uma vez que a RIF impõe uma carga à membrana foi necessário recorrer à correção do efeito electrostático.

O efeito electrostático permite assim obter a constante de partição intrínseca da RIF nas bicamadas lipídicas. Como mostra a equação 6 a constante de partição intrínseca é obtida tendo em conta a constante de partição obtida diretamente, K_P^{obs} , a carga imposta pela RIF à membrana e o potencial da superfície da bicamada.

$$K_P^{obs} = K_P e^{\frac{-ZF\Psi_0}{RT}} \quad (6)$$

O potencial de superfície da bicamada é ajustado segundo duas aproximações, equações 7 e 8.

$$\sigma = \frac{\Psi_0}{|\Psi_0|} \sqrt{2000\varepsilon RT \sum_i C_i \left(e^{-z_i F\Psi_0/RT} - 1 \right)} \quad (7)$$

$$\sigma = e_0 \frac{\sum_j z_j (C_j/n_L)}{\sum_j A_j (C_j/n_1)} \quad (8)$$

Onde ε é a constante dielétrica, R a constante dos gases ideias, F a constante de Faraday, C_i a concentração das espécies carregadas com carga z e e_0 como a carga electrostática elementar. A_j é a área da superfície do componente j da bicamada lipídica, sendo $0,68 \text{ nm}^2$ ⁴⁷ para POPC e para a mistura de PE/PC/PG e $3,0 \text{ nm}^2$ para a RIF, obtida através do programa Marvin Sketch.

Os parâmetros n_j e n_L são os números de moles da membrana do componente j e número de moles de lípido, respetivamente. E a carga RIF inserida em bicamadas de POPC a pH 7,4 foi -0,55, (considerando o pKa = 7,9).³⁰

II.2.4 Espectroscopia de absorção Ultravioleta/Visível

Quando uma molécula absorve um fotão a energia da molécula aumenta, levando a molécula ao estado excitado. Quando a molécula emite um fotão a energia da molécula é reduzida. Ao estado de menor energia de uma molécula é chamado de estado fundamental.⁴⁸

Na espectroscopia de absorção UV/Visível quando a luz é absorvida por uma amostra, a intensidade de radiação, energia por segundo e por área do feixe de luz, diminui. A luz passa através de um monocromador para selecionar o comprimento de onda. Após essa passagem pelo monocromador, a luz monocromática com irradiação P_0 é irradiada sobre a célula de comprimento l . O feixe irradiado vai surgir do outro lado da célula como P . Parte da luz pode ser absorvida pela amostra, logo $P \leq P_0$. Tendo em conta esse valor a intensidade de radiação é possível determinar a transmitância (T), ou seja, a fração de luz que passa através amostra.

$$T = \frac{P}{P_0}; \quad (9)$$

Tendo em conta este parâmetro é possível determinar a absorvância, pela seguinte equação:

$$A = \log\left(\frac{P_0}{P}\right) = -\log T \quad (10)$$

Para ser possível determinar a concentração tendo em conta a absorvância de uma amostra é necessário recorrer à lei de Beer's Lambert.

Esta lei correlaciona o comprimento de célula, l , por onde passou a feixe irradiado, a concentração, c , e a absortividade molar ou coeficiente de extinção molar, intrínseco de cada substância, ϵ .

$$A = \epsilon l c \quad (11)$$

A absorvância é adimensional, o comprimento vem em cm, o ϵ vem em $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e a concentração em M.

Procedimento experimental

Para o ensaio preliminar para a determinação do coeficiente de partição, a titulação de RIF com POPC prosseguiu-se da seguinte maneira. A amostra de $10\mu\text{M}$ de RIF foi previamente preparada através da evaporação do solvente, metanol, e hidratada com a solução tampão, Trizma. A solução de POPC de 20mM foi preparada e hidratada com o mesmo tampão.

A solução de RIF de 2mL foi adicionada a um célula de quartzo de 1cm de comprimento ótico e sucessivas adições de POPC foram realizadas, até perfazer $100\mu\text{L}$.

As absorções foram lidas entre 280 e 600nm. Selecionaram dois comprimentos de onda 430 e 520nm e este último serviu para fazer o ajuste dos valores de absorvância tendo em conta a equação 12. O ajuste foi elaborado através da ferramenta Solver.

A espectroscopia de ultravioleta/visível para a determinação do coeficiente de partição é uma técnica que é baseada nas variações espectrais apresentadas pelo medicamento na presença de concentrações crescentes de lípido e por isso permite determinar a distribuição do medicamento entre a fase aquosa e a fase lipídica, sem que seja necessário a quantificação da droga em cada um dos meios separadamente.⁴⁹

Para este ensaio elaborado através da espectroscopia de absorção UV/Visível a determinação do coeficiente de partição foi obtido tendo em conta a seguinte equação, com ajuda da ferramenta solver do Microsoft Excel.

$$Abs = [RIF]_T \frac{Abs_{RIF} + Abs_{RIF_POPC} K_p \tilde{V}_{POPC}[POPC]}{1 + K_p \tilde{V}_{POPC}[POPC]} \quad (12)$$

O volume molar de POPC considerado foi 0,756 dm³/mol,⁴⁶ as absorvâncias da RIF na fase aquosa (Abs_{RIF}) e na fase lipídica (Abs_{RIF_POPC}), bem como o coeficiente de partição (K_p) foram obtidos através do melhor ajuste da equação 12 usando a ferramenta solver.

Também para determinar as concentrações das soluções de RIF foi utilizada a espectroscopia de UV/Visível. Para essas medições de absorvâncias, as amostras foram analisadas sobre um comprimento de onda entre 200 a 600nm e com uma velocidade de varrimento de 300nm por minuto.

A linha de base foi descontada pela leitura do tampão correspondente à amostra que se pretendia analisar.

A medição foi feita utilizando o Espectrofotómetro UV/Visível Spectronic Unicam UV 500.

II.2.5 Espectroscopia de fluorescência

A luminescência é a emissão de luz proveniente de uma dada substância no estado eletrónico excitado.⁵⁰ Isto é, só há emissão de luz quando a molécula regressa ao seu estado fundamental. E esse regresso ao estado fundamental pode ocorrer de duas maneiras, via relaxação radiativa ou via relaxação não radiativa.

Na relaxação radiativa, esta pode ser de duas maneiras dependendo da natureza do estado excitado. Se o estado excitado for um estado tripleto ocorre o fenómeno de

fosforescência, se o estado excitado estiver no estado singleto o fenómeno ocorrido é a fluorescência, em que parte deste trabalho incide.

Estes fenómenos tanto de fosforescência como de fluorescência podem ser representados segundo o diagrama de Jablonsky.

Este diagrama representa os vários estados eletrónicos das moléculas (S_0 , S_1 , S_2 , S_3, \dots, S_N) e que têm associados vários estados intermédios relativos a vibrações e rotações das mesmas. De realçar que a emissão de luz quer de fluorescência ou fosforescência ocorre só após a relaxação até ao nível de menor energia do primeiro estado excitado S_1 ou T_1 , como mostra a figura 5.

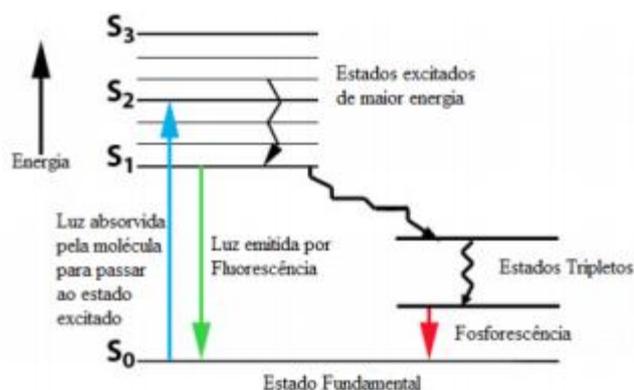


Figura 5: Diagrama de Jablonsky

O fenómeno de fluorescência ocorre como já indicado em cima se o estado vibracional excitado for singleto, ou seja, o eletrão na orbital excitada tem o spin emparelhado com o spin do eletrão da orbital do estado S_0 . O retorno ao estado fundamental é permitido por spin.

Procedimento experimental

Para perceber se a RIF causava variações nas propriedades das membranas lipídicas, foram feitos estudos de permeação de pequenas moléculas através da membrana, que neste trabalho foi com a CBF.

A CBF é uma molécula amplamente usada em estudos biológicos, farmacológicos e em estudos bioquímicos, por exemplo como detetores de fluorescência da lise dos lipossomas, o que permite determinar a sua estabilidade.⁵¹

Soluções concentradas de CBF a pH neutro são extintas por fluorescência.⁵² As propriedades de fluorescência de auto-extinção têm sido usadas para monitorizar a integridade e a taxa de libertação da carboxifluoresceína.⁵³

Neste estudo foram adicionadas concentrações de RIF aos lipossomas contendo CBF e foi analisada a percentagem da saída da CBF dos lipossomas.

Para obter o valor máximo de percentagem de saída de CBF foi adicionado às amostras cerca de 100 μ M de Triton-X. Esta adição permitiu a destruição dos lipossomas e consequentemente a saída total da CBF. Os resultados foram ajustados através da ferramenta solver do Microsoft Excel.

Antes de se iniciar o estudo da cinética de permeação da CBF em lipossomas com a adição da RIF, foi necessário medir o espectro de fluorescência das amostras a fim de se analisar se a CBF ainda estaria disponível dentro dos lipossomas. Foi também necessário medir o espectro de fluorescência após a cinética para se avaliar o efeito de fotodegradação das sondas utilizadas, uma vez que o tempo de medição foi grande e a amostra esteve sob radiação intensa.

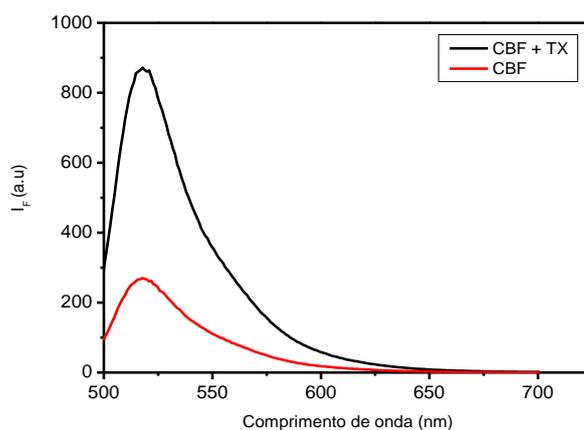


Figura 6: Espectros de fluorescência da amostra contendo POPC 0,4mM CBF 50mM, a vermelho. Curva a preto representa a fluorescência após com a adição de Triton-X 100 μ M a 25°C.

Após todas as considerações relevantes, iniciaram-se as experiências de cinéticas seguidas por fluorescência, recorrendo às amostras de LUV's com CBF recolhidas pela coluna de exclusão. Às amostras de LUV's com CBF, hidratadas com tampão fosfato, foram adicionadas diferentes concentrações de RIF.

II.2.5.1 Preparação de LUV'S com CBF

Foi preparada previamente uma solução de CBF em metanol e posteriormente evaporada a fim de ser hidratada com uma solução contendo LUV's, tendo em conta a concentração desejada. Após a hidratação a amostra foi levada à extrusão, sendo encaminhada para a coluna a fim de se obter LUV's com CBF no seu interior. Após isso fica pronta para ser utilizada em ensaios por espectroscopia de fluorescência.

II. 2.5.2 Cromatografia de exclusão

Da suspensão de LUV's contendo CBF, cerca de 0,15mL foram passados por 3 colunas, HiTrap Desalting contendo como fase estacionária Sephadex G-25 Superfine, em série que anteriormente tinham sido hidratadas e resuspensas através da passagem de com solução tampão fosfato, pH 7,4 em cerca de 10mL cada uma.

Após a passagem de determinado volume de tampão na coluna, os LUV's contendo CBF foram eluídos no *void* volume (volume morto) da coluna e recolhidos em tubos de ensaio. A CBF livre é eluída no coluna após passagem de um volume superior, uma vez que como possui dimensões menores penetra nos poros da resina da coluna. Desta forma é possível recolher-se apenas os LUV's contendo CBF no seu interior. De seguida leva-se a amostra dos diferentes tubos ao espectrofotómetro de UV/Visível a fim de comprovar a presença de LUV's. Os tubos que apresentam a presença de LUV's são posteriormente juntos num tubo só e diluídos com solução tampão para a concentração final desejada.

De realçar que os tubos com a amostra que sai da coluna são prontamente colocados em gelo para evitar a saída da CBF do interior dos LUV's.

II.2.6 Dispersão dinâmica de luz

A técnica de dispersão dinâmica de luz é uma técnica não invasiva que permite medir o tamanho de coloides, nano-partículas e macromoléculas.

Esta técnica considera que as partículas e moléculas estão em constante movimento aleatório, dependente da temperatura, chamado movimento Browniano.

A velocidade de difusão das partículas está relacionada com o tamanho das partículas. Isto é, quando mais pequenas forem as partículas, maior será a velocidade de difusão do que quando estas forem grandes.

Na medida em que devido ao movimento Browniano, os eletrões são fontes móveis de radiação, a frequência pode ser alterada de alta para baixa dependendo da velocidade e direção relativa ao detetor

Para os ensaio de DLS em vez se trabalhar no domínio da frequência é preferível trabalhar no domínio do tempo. E assim o coeficiente de difusão pode ser obtido por meio de uma função de auto-correlação. Considerando I_t , o número de fotões que chegam ao detetor a um determinado tempo t , a função de auto-correlação é então construída pela multiplicação do número de fotões em dois sucessivos intervalos de tempo.

$$G(\tau) = \langle I(t) I(t + \tau) \rangle \quad (13)$$

Através da função de auto-correlação é possível obter-se o diâmetro hidrodinâmico das partículas considerando a equação de Stokes-Einstein. A definição de diâmetro hidrodinâmico enuncia o diâmetro de uma esfera rígida que difunde como a mesma velocidade da partícula ou molécula a ser medida.

$$D_0 = \frac{2kT}{6\pi\eta R_h} \quad (14)$$

Procedimento experimental

Antes de se proceder à medição dos tamanhos, as amostras de POPC_RIF que foram previamente verificadas em termos de intensidade da espécie a ser medida, isto é, em termos de população da espécie. Para uma $5,0 \times 10^4 < I > 1 \times 10^6$, o resultado é o mais exato.

Para os ensaios realizados, a intensidade de luz dispersa pelas amostras mostrou-se sempre próxima de 10^6 .

O laser utilizado foi de He-Ne com um comprimento de onda de 633nm como fonte de luz. O ângulo do detetor em relação ao laser foi de 90° e a temperatura foi sempre de 25°C . Para a maioria das amostras foram realizadas 4 repetições. As medições foram realizadas no equipamento Beckam Coulter N5 Submicron Particle Size Analyzer.

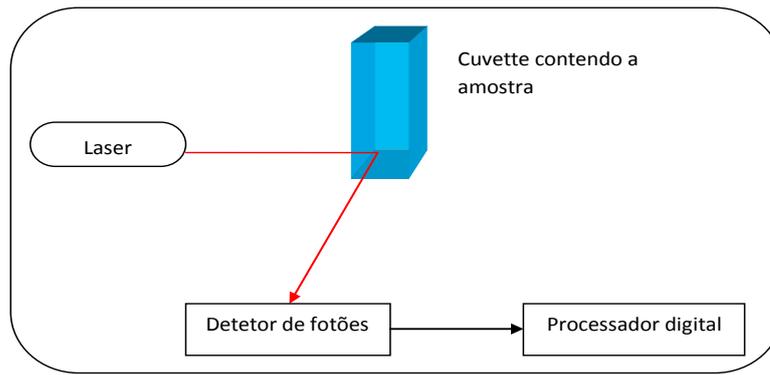


Figura 7: Representação esquemática do aparelho de dispersão dinâmica de luz.

Capítulo III

Resultados e Discussão

III.1 Estudo da partição da RIF para membranas lipídicas de POPC.

Foi efetuado um ensaio preliminar para determinar o coeficiente de partição da RIF entre a fase aquosa e vesículas unilamelares grandes (LUVs) de POPC, utilizando espectroscopia de absorção no UV/Visível. Os resultados obtidos para a absorvância da RIF na presença de diferentes concentrações de POPC estão apresentados na Figura 8A. Observa-se que na presença de POPC ocorre um desvio no máximo de absorvância para maiores comprimentos de onda. Este desvio pode ser seguido através do valor de absorvância a 520 nm, o qual está representado no painel B.

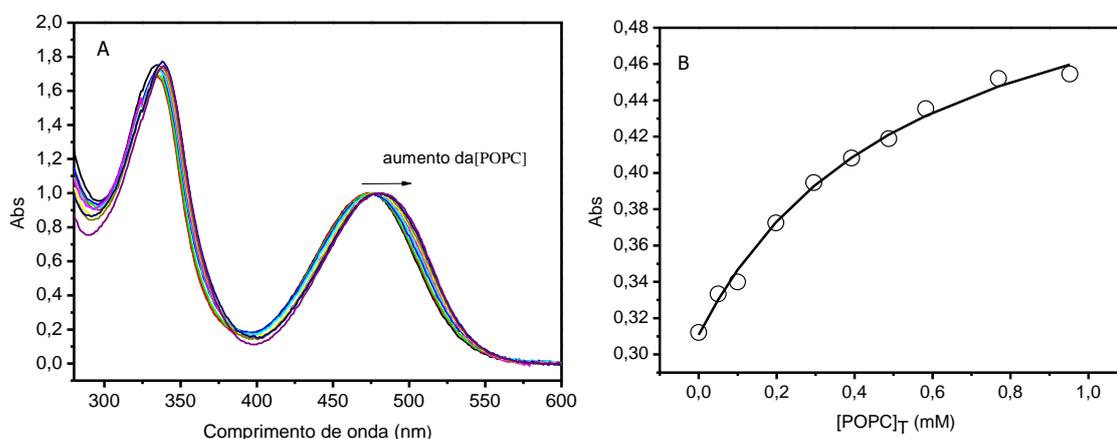


Figura 8: Titulação de RIF 10 μ M com POPC a diferentes concentrações. Painel A: Absorção da amostra de RIF com diferentes concentrações de POPC. Painel B: Os pontos representam a absorvância da RIF a 520nm e a linha é o melhor ajuste da equação 12.

A variação na absorvância a 520 nm foi ajustada pela equação 12, permitindo obter o valor do coeficiente de partição (K_P^{obs}) a partir do qual se pode calcular a variação de energia livre de Gibbs (ΔG°) que estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Coeficiente de partição e variação na energia livre de Gibbs obtidos por espectroscopia UV/Visível a 37 °C, considerando que todo o lípido está acessível à RIF.

K_P^{obs}	$3,2 \times 10^3$
ΔG° (kJ/mol)	-19,9

A interação da RIF com a bicamada de POPC foi também caracterizada por Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC). O termograma obtido para a titulação de uma solução 10 μM de RIF encontra-se apresentado na Figura 9 painel A. Observa-se que a adição de lípido conduz a uma diminuição na potência fornecida pelo equipamento para manter o sistema à temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$, o que indica que a interação da RIF com o POPC é exotérmica. O calor libertado aquando da primeira injeção de POPC é o mais elevado refletido a grande quantidade de RIF que particiona para a bicamada lipídica. À medida que é adicionado mais POPC, o calor libertado diminui pois a quantidade de RIF que particiona para o novo POPC adicionado é menor. Após a 5^a injeção o calor mantém-se constante indicando que a RIF já se encontra essencialmente toda associada à bicamada lipídica, este calor designa-se por calor de diluição.

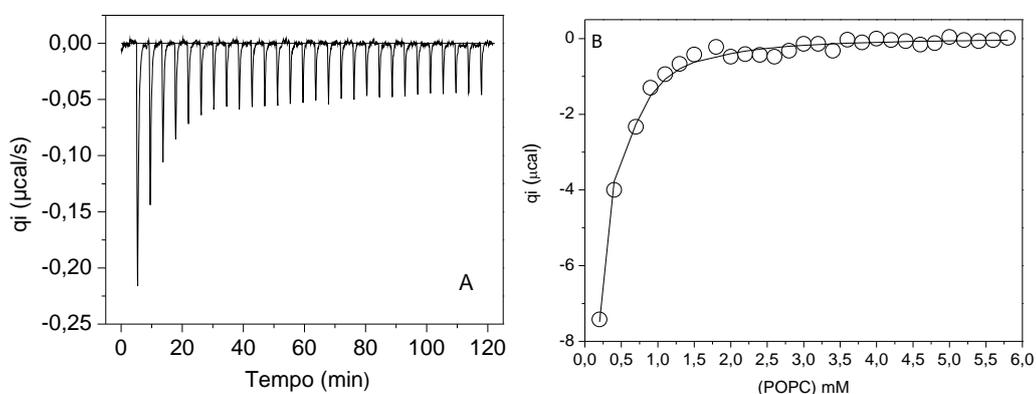


Figura 9: Titulação de RIF 10 μM com POPC a diferentes concentrações. Painel A: Termograma da titulação da RIF com diferentes concentrações de POPC. Painel B. A linha é o melhor ajuste das equações 1 a 3 aos resultados experimentais.

Na Figura 9B encontra-se representado o calor corresponde a cada injeção de POPC, após subtração do calor de diluição. A linha corresponde ao melhor ajuste das equações 1 a 3, conduzindo aos valores de coeficiente de partição e parâmetros termodinâmicos apresentados na Tabela 3.

Os valores obtidos pelas duas técnicas para o coeficiente de partição são muito semelhantes, cerca de 3×10^3 . Este valor mostra que a RIF interage mais favoravelmente com a bicamada de POPC do que com a fase aquosa. Os resultados obtidos por ITC permitem avaliar se a partição se deve ao estabelecimento de interações favoráveis com a membrana ou ao efeito hidrofóbico. O valor obtido para a variação de entalpia ($\Delta H^{\circ} = -6,7 \text{ kJ/mol}$) sugere a ocorrência de interações com a membrana, no entanto a variação de entropia é positiva ($T\Delta S^{\circ} = 13,0 \text{ kJ/mol}$) o que leva a concluir que o efeito

hidrofóbico poderá ter uma contribuição importante. De notar que a variação de entalpia medida por ITC pode incluir outros processos para além da interação com a membrana, nomeadamente alterações na ionização da RIF aquando da partição. Para concluir sobre a importância da contribuição do efeito hidrofóbico é assim necessário obter a variação de entalpia associada à partição da RIF para a membrana. Este estudo será apresentado na secção seguinte.

Tabela 3: Coeficiente de partição e parâmetros termodinâmicos obtidos por ITC a 25 °C, considerando que todo o lípido está acessível à RIF.

K_p^{obs}	$2,8 \times 10^3$
ΔG° (kJ/mol)	-19,7
ΔH° (kJ/mol)	- 6,7
$T\Delta S^\circ$ (kJ/mol)	13,0

III.2 Determinação da variação na ionização da RIF devido à partição para bicamadas de POPC

A variação de entalpia obtida numa experiência de ITC reflete a quebra/estabelecimento de interações entre a RIF e as fases aquosa e lipídica, mas pode também ser afetada por alterações na ionização da RIF aquando da partição entre as duas fases. A contribuição de eventuais variações na ionização pode ser avaliada mediante a realização de titulações em tampões de pH com diferentes entalpias de ionização.⁵⁴ Para tal efetuaram-se várias experiências de partição, com [RIF] = 20 μ M, com diferentes soluções tampão, Trizma, Hepes e Fosfato. Os tampões de pH escolhidos apresentam uma grande diferença nos seus valores de $\Delta H^\circ_{ionização}$ (Trizma = 47,45 kJ/mol, Hepes = 20,4 kJ/mol e Fosfato = 3,6 kJ/mol).⁵⁵

A dependência da entalpia observada para a partição ($\Delta H^{\circ,obs}$) com as entalpias de ionização do tampão (ΔH^{ioniz}) permite obter a variação de H^+ transferidos da solução tampão para a RIF (ΔnH^+) quando esta associa à bicamada lipídica, equação 15.

$$\Delta H^{o,obs} = \Delta H^{o,part} + \Delta nH^+ \Delta H^{ionização} \quad (15)$$

Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 10.

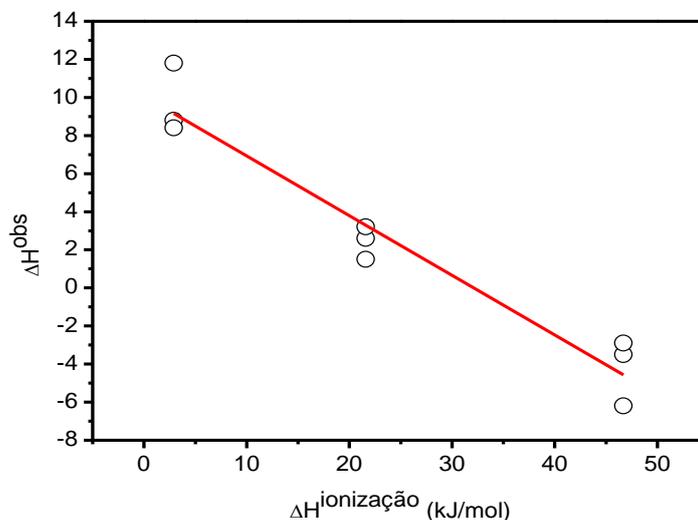


Figura 10: Dependência da variação de entalpia observada associada à partição de RIF para a bicamada lipídica. A linha é o melhor ajuste dos resultados experimentais indicando uma variação na entalpia de partição intrínseca de $10,1 \pm 1,2$ kJ/mol e uma transferência de $\Delta nH^+ = -0,31 \pm 0,04$ kJ/mol.

A variação de entalpia associada à partição entre a fase aquosa e a bicamada de POPC é dada pela ordenada na origem do melhor ajuste da equação 15 aos resultados experimentais, $\Delta H_{part} = 10,1$ kJ/mol. Ao contrário do que foi enunciado na secção anterior, com os resultados obtidos em tampão Trizma, a interação da RIF com a bicamada de POPC é endotérmica. O aumento na entropia do sistema devido à partição da RIF para a bicamada de POPC é assim o único fator favorável, indicando que a associação à membrana se deve essencialmente ao efeito hidrofóbico.

Tabela 4: Parâmetros termodinâmicos e variação na ionização para a partição da RIF entre a fase aquosa e bicamadas de POPC.

ΔG° (kJ/mol)	-19,7
$\Delta H^{o,part}$ (kJ/mol)	$10,1 \pm 1,2$
$T\Delta S^{o,part}$ (kJ/mol)	29,8
ΔnH^+	$-0,31 \pm 0,04$

O declive da reta indicada na Figura 10 fornece o nº de H^+ transferidos do tampão para a RIF aquando da sua partição para a bicamada de POPC. O valor obtido, $\Delta nH^+ = -0,31$, indica que a RIF cede protões ao tampão.

A RIF possui dois grupos ionizáveis, um dos grupos fenóis ($pK_a=1,7$) e o grupo piperazina ($pK_a=7,9$)³⁰. Ao valor de pH das experiências (7,4), o grupo fenol encontra-se completamente ionizado com uma carga de -1. A carga associada ao grupo piperazina pode ser encontrada através da equação de Henderson–Hasselbalch sendo igual a +0,76. A carga global da RIF na fase aquosa é assim igual a -0,24. Aquando da partição para a membrana, a RIF cede 0,31 protões para o tampão adquirindo uma carga global de $z_{RIF_M} = -0,55$.

Dados os valores de pK_a é de esperar que o grupo fenol se mantenha completamente desprotonado ficando o grupo piperazina com uma carga média de 0,45. A diminuição da carga associada à piperazina sugere uma inserção deste grupo numa região mais profunda da membrana.

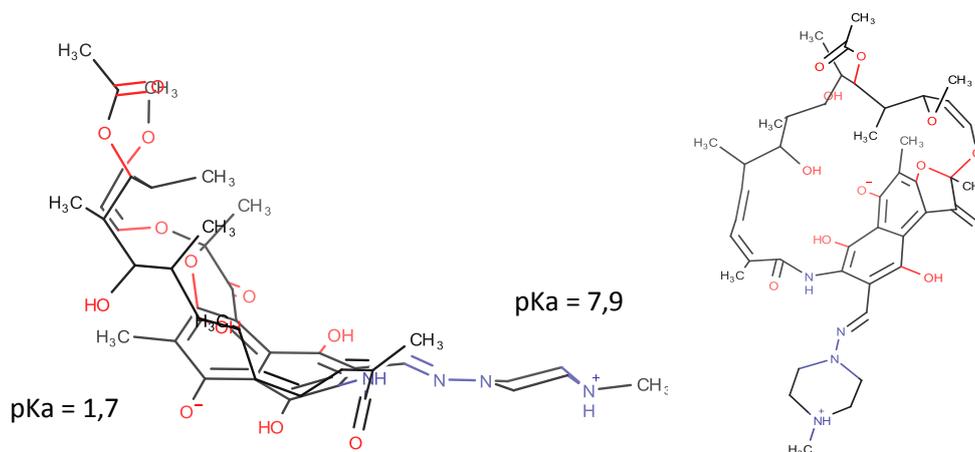


Figura 11: Estrutura da RIF protonada com indicação dos grupos ionizáveis e respetivos valores de pK_a .

A carga da RIF quando inserida na membrana foi também caracterizada por potencial zeta, confirmando a sua carga global negativa. Foram caracterizadas diferentes razões POPC_RIF verificando-se um aumento no potencial zeta com o aumento da concentração de RIF. Os valores obtidos para uma concentração de POPC igual a 1 mM e RIF a concentrações de 40 e 100 μM (- 9 e -15 mV, respetivamente) são compatíveis com a carga global de -0,55 para a RIF calculada a partir da variação da entalpia com os diferentes tampões, e um coeficiente de partição de cerca de 10^3 .

III.3 Acessibilidade da RIF ao lípido

A atividade de muitas biomoléculas e fármacos dependem em grande parte da capacidade que estas têm de se ligar a recetores das membranas, ou à matriz lipídica da membrana ou ainda na capacidade de atravessar a membrana para atuar dentro da célula.⁴⁵ Para esses casos é necessário conhecer o mecanismo de interação da molécula com a membrana, nomeadamente se esta só interage com a monocamada externa ou se consegue permear através da membrana e interagir com a monocamada interna. Uma estratégia que permite avaliar a ligação à membrana e/ou permeação através dela é conjugando os protocolos de *uptake* e *release*. Esta estratégia é baseada na conjugação dos calores gerados ao longo da titulação quando os lipossomas são adicionados ao soluto, (*uptake*) e quando os lipossomas previamente em equilíbrio com o soluto são diluídos para a solução tampão, (*release*). A figura 12 mostra a representação esquemática destes dois protocolos.

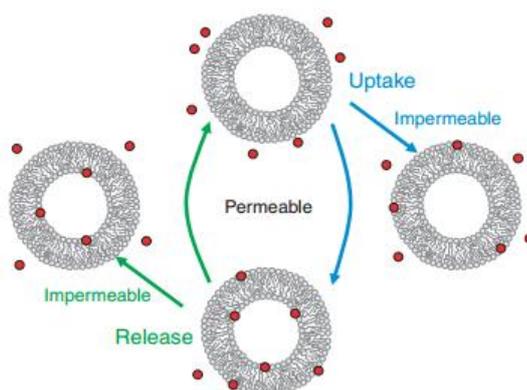


Figura12: Ilustração esquemática dos protocolos de *uptake* e *release*, adaptado de Tsamaloukas⁴⁵

Para a realização deste trabalho, como indicado no capítulo II, a solução lipídica encontra-se na forma de vesículas unilamelares grandes, LUV's. Nesse sentido quando um soluto é adicionado aos LUV's este tende a associar-se em primeiro lugar à monocamada externa e subseqüentemente após translocação pela membrana, interagir com a monocamada interna. O ajuste global das equações 4 e 5 aos resultados obtidos segundo os protocolos de *uptake* e de *release* permite calcular o parâmetro γ , que fornece informação relativamente à velocidade de translocação do soluto pela membrana. Esse parâmetro normalmente toma valores entre 0,5 e 1. Um valor de γ igual a 0,5 indica uma translocação lenta pela membrana e conseqüentemente só metade da superfície do lípido

está acessível ao soluto. Por outro lado, um valor de γ igual a 1 indica que a translocação é rápida o que leva a que o lípido esteja totalmente acessível ao soluto.

O valor de gama obtido através dos dois protocolos para este trabalho foi de $\gamma=0,5$, como indicado na figura 13B.

A figura 13A mostra o calor gerado nas diferentes experiências realizadas segundo os dois protocolos, onde observa-se uma assimetria entre os protocolos de *uptake* e o protocolo de *release*. Esta assimetria é assim esperada, uma vez que o gama obtido foi 0,5. Como dito no início desta seção quando uma translocação é lenta, $\gamma = 0,5$, só metade do lípido, monocamada externa, está acessível a equilibrar com o soluto nos protocolos de *uptake* e que só metade do soluto associado ao lípido nos protocolos de *release* é que vai equilibrar com o meio aquoso. O que leva a que as curvas de titulação de *uptake* e *release* não sejam simétricas.

A dependência do χ^2 com o valor de γ descreve uma parábola o que permite definir o intervalo para os valores de γ com uma confiança de 95 % (0,32 a 0,63) e com uma confiança de 99 % (0,3 a 0,66).⁵⁶

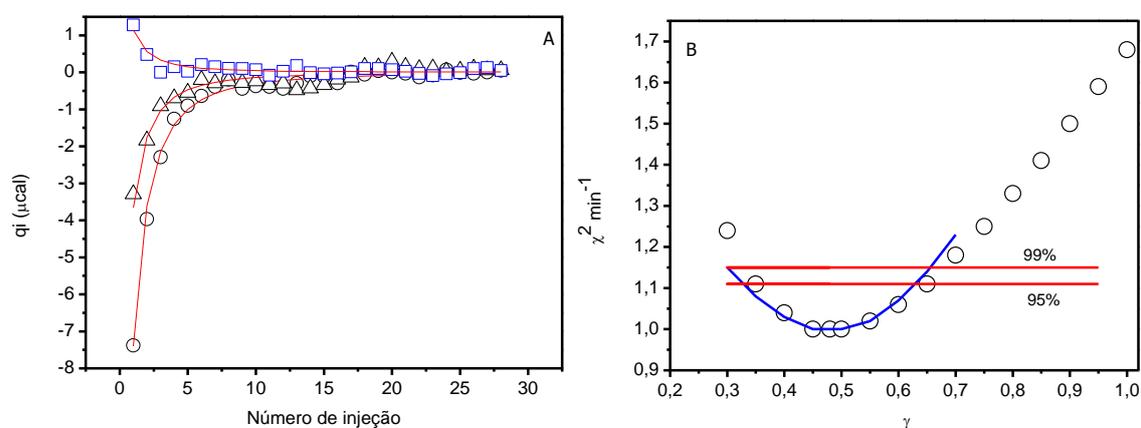


Figura 13: Paine A: Curvas obtidas para as titulações de RIF com diferentes concentrações de POPC, para os protocolos uptake (O, Δ) e release (\square) a 25°C. Paine B: Dependência da qualidade do ajuste global (χ^2) com o valor de γ . As linhas horizontais representam os intervalos para o valor de γ com uma confiança de 95 e 97.5 %.⁵⁶

Para além da velocidade de translocação do soluto, existem alguns fatores que podem contribuir para que o parâmetro γ adquira um determinado valor, nomeadamente a presença de multilamellaridade nos lipossomas. Esta propriedade pode ser avaliada através da redução do NBD- C_{16} , previamente equilibrado com os lipossomas, por ação de

ditionito adicionado à solução aquosa no exterior dos lipossomas. O grupo NBD é fluorescente, mas a redução do grupo NO_2 a NH_2 torna-o não fluorescente, figura 14.

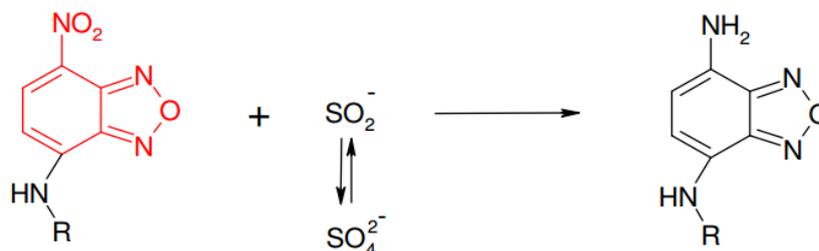


Figura 14: Redução do grupo do NBD pelo dititionito⁵⁷

A diminuição da intensidade de fluorescência do NBD- C_{16} , incorporado em lipossomas de POPC com a razão molar de 1:1000, devido à adição de dititionito encontra-se apresentada na figura 15.

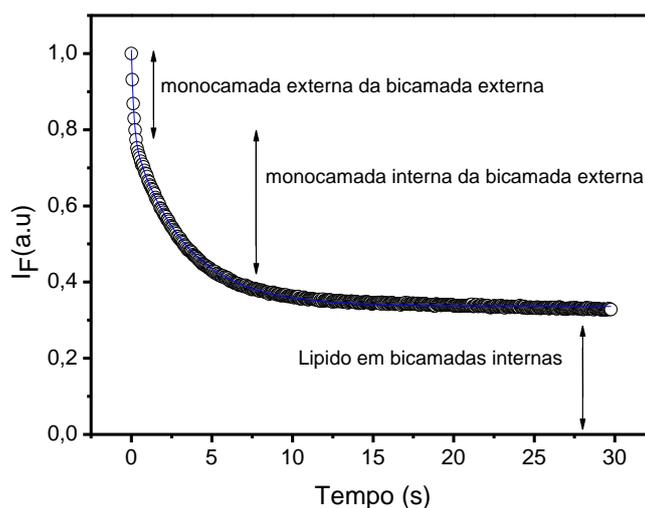


Figura 15: Curva típica obtida para a diminuição da intensidade de fluorescência do NBD- C_{16} incorporado em lipossomas de POPC, devido à adição de dititionito. Os diferentes passos observados na diminuição de fluorescência estão identificados.

Cerca de 30 % da intensidade de fluorescência é extinta muito rapidamente, correspondendo ao NBD- C_{16} localizado na monocamada externa dos lipossomas ($f_{\text{fora}}^{\text{o}}$). Até cerca de 10 s observa-se uma extinção adicional de cerca de 40 % da fluorescência, que corresponde ao NBD- C_{16} inicialmente na monocamada interna da bicamada externa dos lipossomas que translocou para a monocamada externa onde reagiu com o dititionito ($f_{\text{fora}}^{\text{i}}$). Segue-se uma diminuição muito lenta na intensidade de fluorescência que se deve à permeação do dititionito através da bicamada externa dos lipossomas⁵⁸ onde irá reagir

com o NBD-C₁₆ localizado nas bicamadas internas, e/ou à desorção do NBD-C₁₆ da bicamada interna para a bicamada externa onde pode reagir com o ditonito.⁵⁹ A intensidade de fluorescência correspondente a este passo mais lento corresponde à fração do lípido em bicamadas internas, ou seja à fração de multilamelaridade.

Um soluto que apresente uma velocidade de translocação muito lenta só irá interagir com o lípido na monocamada externa da bicamada externa. Nestas condições o valor esperado para o γ seria de 0,3. Caso a velocidade de translocação seja rápida mas a transferência entre bicamadas lipídicas seja lenta, será de esperar que todo o lípido na bicamada externa esteja acessível ao soluto; neste caso o valor obtido para γ seria 0,7. O valor obtido para a RIF sugere que ocorre alguma translocação da RIF para a monocamada interna durante o tempo da realização do ITC, mas em que a velocidade de translocação não é suficiente para o estabelecimento do equilíbrio.

Esta caracterização dos lipossomas em termos da sua multilamelaridade não foi efetuada para todas as amostras e é de esperar alguma dependência com a concentração total de lípido (aumento da fração de multilamelaridade com a concentração).⁶⁰

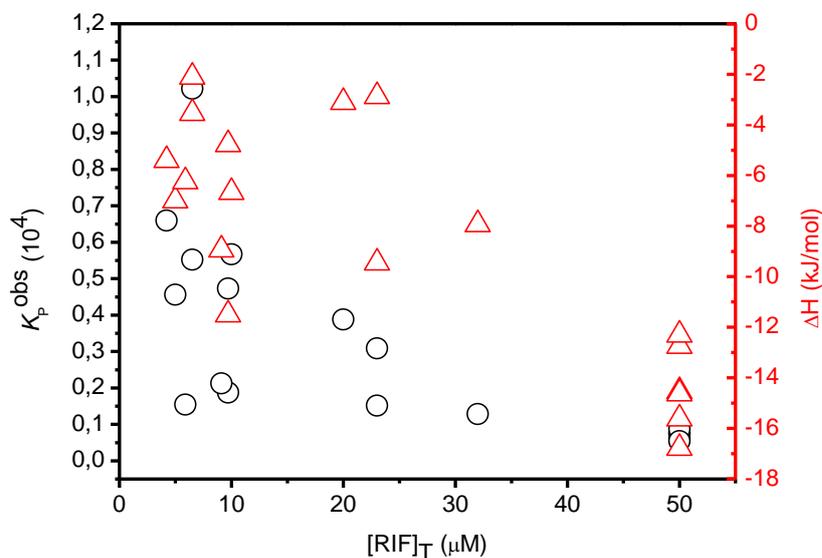
Neste trabalho foi assim considerado um valor de 0,5 para o lípido acessível à RIF, o qual corresponde ao obtido nas experiências de ITC segundo os protocolos de *uptake* e *release*. Em conjunto estes resultados conduzem a uma variação de entalpia (-6,3 kJ/mol) que é muito semelhante ao obtido anteriormente considerando apenas o protocolo de *uptake*. No entanto, o coeficiente de partição observado é cerca do dobro ($K_P^{\text{obs}} = 6,3 \times 10^3$), esta variação deve-se ao facto de que apenas metade do lípido em solução está acessível à RIF enquanto na seção 1.1 deste capítulo foi considerado que todo o lípido estava acessível.

III.4 Efeito da concentração da RIF

III.4.1 Interação da RIF com bicamadas lipídicas de POPC

Para se obter a partição de uma molécula para a membrana biológica é necessário ter em conta os eventuais efeitos que determinada concentração do ligando provoque na membrana. Esses efeitos foram avaliados através da dependência do coeficiente de partição observado com a concentração total de RIF, quando titulado com LUV's de POPC, em tampão Trizma, a diferentes concentrações a 25 °C.

Os resultados da dependência do K_P^{obs} com a concentração total de ligando estão representados na figura 16, considerando um fator de acessibilidade, $\gamma=0,5$.



hidrofóbico na partição da RIF para a membrana de POPC. No entanto, a alteração nos parâmetros termodinâmicos para a partição da RIF entre a fase aquosa e a membrana pode também dever-se a perturbação da membrana para as concentrações elevadas de RIF.

Para avaliar eventuais perturbações na membrana é relevante considerar a concentração local de RIF. A razão lípido acessível por RIF associada à membrana ($\text{POPC}:\text{RIF}_M$) após a primeira injeção de lípido encontra-se representada na figura 17. Observa-se que os valores de $\text{POPC}:\text{RIF}_M$ não diminuem significativamente com a concentração total de RIF, correspondendo a uma concentração local de RIF na membrana independente da concentração total. Este resultado sugere que a membrana de POPC já se encontra saturada com RIF mesmo para as baixas concentrações utilizadas, sendo que um aumento na concentração total de RIF é acompanhado por uma diminuição correspondente no valor do coeficiente de partição.

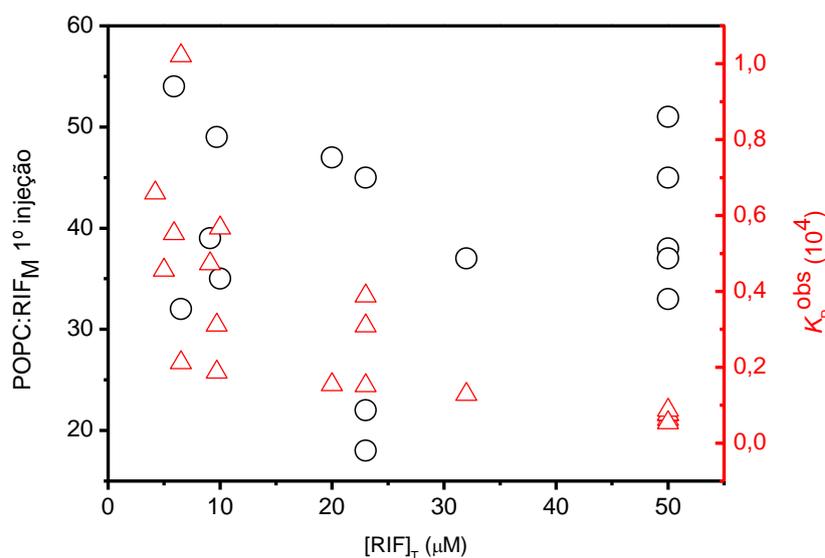


Figura 17: Titulação de RIF a diferentes concentrações com POPC. Rácio $\text{POPC}:\text{RIF}_M$ (1ª injeção, O) e coeficiente de partição observado, (K_p^{obs} , Δ) obtidos pelo melhor ajuste das equações de 1 a 3 dos resultados experimentais.

Para concentrações ainda mais elevadas de RIF_T , a curva obtida para a variação de calor com a concentração de lípido não é bem descrita pelo modelo de partição simples, como se pode observar na figura 18B para uma concentração total de RIF igual a 100 μM. Nestas condições observa-se também que a interação da RIF com a membrana apresenta uma componente endotérmica e outra exotérmica, o que sugere que a RIF está a perturbar fortemente a membrana.

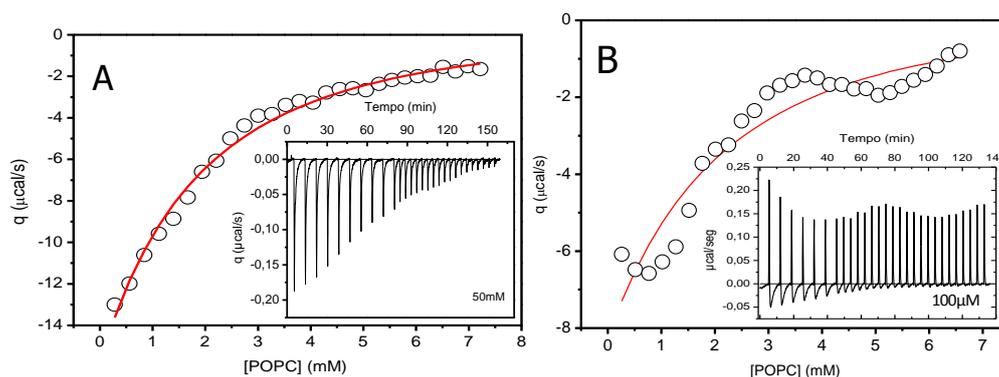


Figura 18: Titulação de RIF a diferentes concentrações com diferentes concentrações de POPC. Gráfico A. Curva da titulação obtida para uma $[RIF]_T$ de $50 \mu M$. A linha é o melhor ajuste obtido pelas equações de 1 a 3, a $25^\circ C$, $\gamma = 0,5$; $K_P^{obs} = 6,25 \times 10^3$, $\Delta H = -12,74$ kJ/mol. Gráfico B: Curva da titulação obtida para uma $[RIF]_T$ de $100 \mu M$. A linha é o melhor ajuste obtido pelas equações de 1 a 3, a $25^\circ C$, $\gamma = 0,5$; $K_P^{obs} = 5,5 \times 10^2$, $\Delta H = -4,21$ kJ/mol.

Analisando os parâmetros obtidos, o K_P^{obs} apresenta um valor de partição baixo bem como o ΔH , sendo que este resulta da conjugação da parte endotérmica e exotérmica da apresentada no termograma da titulação. Analisando o painel A onde está apresentando uma titulação para uma concentração de RIF total de $50 \mu M$ verifica-se que o ajuste obtido é razoavelmente bom. O que dá origem a um K_P^{obs} que está na gama de coeficientes de partição apresentados na figura 16.

Outra informação que podemos retirar destes dois termogramas é a diferença quanto à variação de calor gerado ao longo das injeções. Analisando o painel A podemos observar que ao longo das injeções de POPC ao ligando o calor gerado vai diminuindo, o que demonstra que ao longo das injeções a titulação vai-se completando, de forma a no final o calor gerado ser muito pequeno. No caso do painel B o calor gerado na componente endotérmica é quase constante em toda a extensão da titulação, enquanto se observa uma diminuição significativa na componente exotérmica. A componente endotérmica foi artificialmente retirada dos resultados experimentais através do calor de diluição, embora o valor necessário para este parâmetro ($q_{dil} = 0,48 \mu cal/\mu L$) esteja claramente fora do valor obtido com a diluição do lípido em tampão.

Conforme descrito na secção 1.2 deste capítulo, a RIF quando associada à bicamada lipídica apresenta uma carga global negativa. Assim, a primeira causa que deve ser considerada para a diminuição observada no valor do coeficiente de partição com a concentração de RIF_T na gama de 5 a $50 \mu M$, é o efeito electrostático. Ao particionar

para a membrana, a RIF impõe nesta uma carga negativa que vai provocar uma diminuição no coeficiente de partição observado. A constante de partição intrínseca, descontando os efeitos eletrostáticos, pode ser obtida através do melhor ajuste com as equações (6) a (8) que consideram o formalismo de Gouy-Chapman para o cálculo da carga à superfície da membrana.

Os resultados obtidos para o potencial à superfície da membrana e para a razão entre o K_P intrínseco e o K_P^{obs} , encontram-se representados na figura 19. Observa-se que o potencial de superfície é sempre muito pequeno, entre -0,5 e -3 mV (painel A), o que conduz a valores de K_P muito semelhantes aos do K_P^{obs} (painel B). Este resultado era esperado pois a concentração local de RIF na membrana é sempre muito baixa, razões POPC:RIF_M superiores a 20 (figura 17). Conclui-se assim, que a diminuição no coeficiente de partição observada com o aumento da concentração de RIF não é devida à carga imposta por esta na membrana.

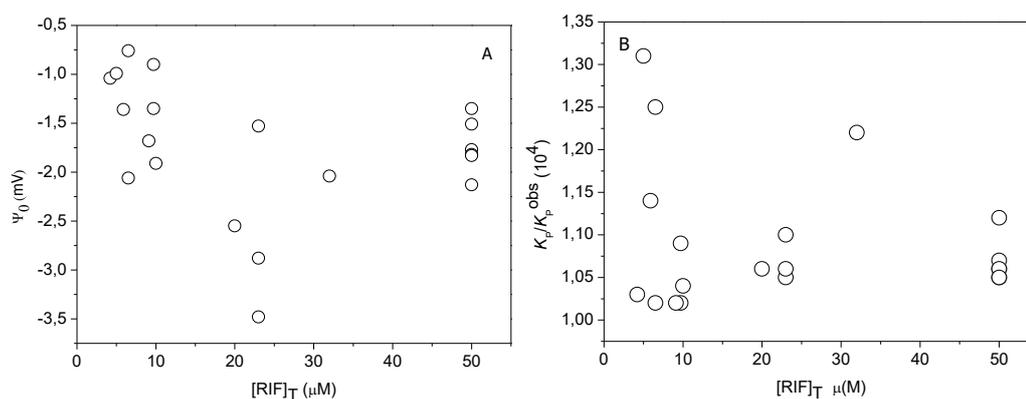


Figura 19: Titulação de RIF a diferentes concentrações com diferentes concentrações de POPC. Painel A: Potencial, Ψ_0 , gerado na superfície da membrana com a titulação de RIF com POPC. Painel B: Rácio do coeficiente de partição observado com o coeficiente de partição intrínseca

Durante a realização deste trabalho também foi avaliado o efeito da força iónica no coeficiente de partição da RIF para a membrana de POPC, bem como o efeito da concentração total de RIF. Para tal foi preparada uma solução tampão Trizma sem cloreto de sódio. Os resultados obtidos estão apresentados na figura 20. Globalmente observa-se uma ligeira diminuição nos valores de K_P^{obs} com a diminuição da força iónica, embora em algumas experiências tenham sido obtidos valores muito semelhantes. A dependência do coeficiente de partição com a concentração total de RIF mostra uma ligeira diminuição, semelhante ao observado na presença de 150 mM de NaCl.

Na ausência de NaCl, o potencial de superfície gerado devido a uma determinada densidade de carga é superior. Nas condições das experiências apresentadas na figura 20, o potencial de superfície variou entre $-2,9$ e -8 mV. Estes valores de potencial de superfície conduzem a pequenas alterações no coeficiente de partição, não justificando a variação observada no K_P^{obs} com a concentração total de RIF.

Variações na força iônica não conduzem a alterações significativas na variação de entalpia para a associação da RIF às membranas de POPC, figura 20B.

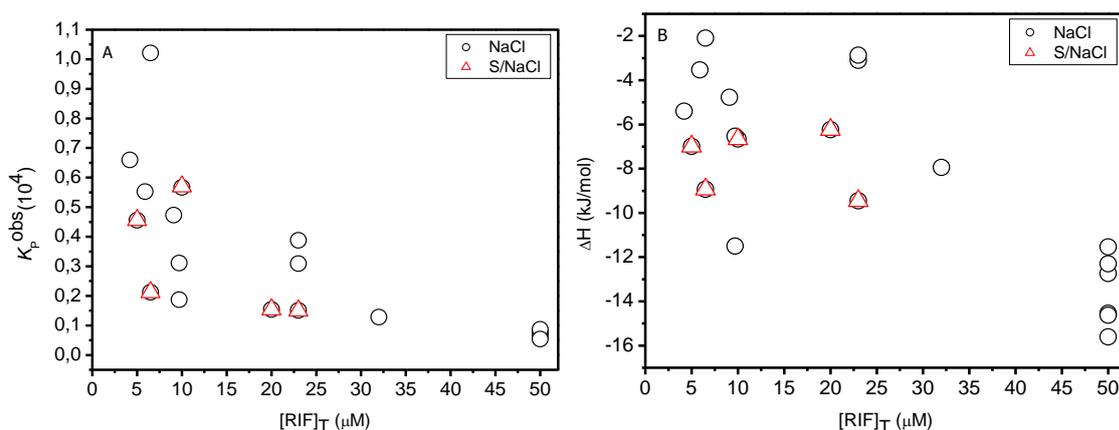


Figura 20: Titulação de RIF a diferentes concentrações com POPC. Painel A: Coeficiente de partição observado das amostras sem NaCl (Δ) e com NaCl (O) obtido pelo melhor ajuste das equações de 1 a 3. Painel B: Variação da entalpia das amostras sem NaCl (Δ) e com NaCl (O) obtida pelo melhor ajuste da equações de 1 a 3.

O procedimento usualmente seguido para obter a partição de moléculas para bicamadas lipídicas, é titular o ligando com o aumento da quantidade de lípido, e este foi o seguido para obter os resultados apresentados até aqui.^{61,62} Um procedimento alternativo consiste na adição de ligando ao lípido, sendo necessário realizar várias experiências independentes (cada uma com a sua concentração de lípido) para obter o coeficiente de partição e variação de entalpia associada. Uma vantagem deste procedimento é a possibilidade de utilizar concentrações de lípido mais elevadas.

Seguindo este último procedimento foram realizadas 9 titulações com diferentes concentrações de lípido, numa gama de 0,15 e 10 mM, adicionando pequenos volumes de uma solução de RIF 200 μM .

Os termogramas apresentados na figura 21 mostram algumas das titulações realizadas tendo em conta esta metodologia.

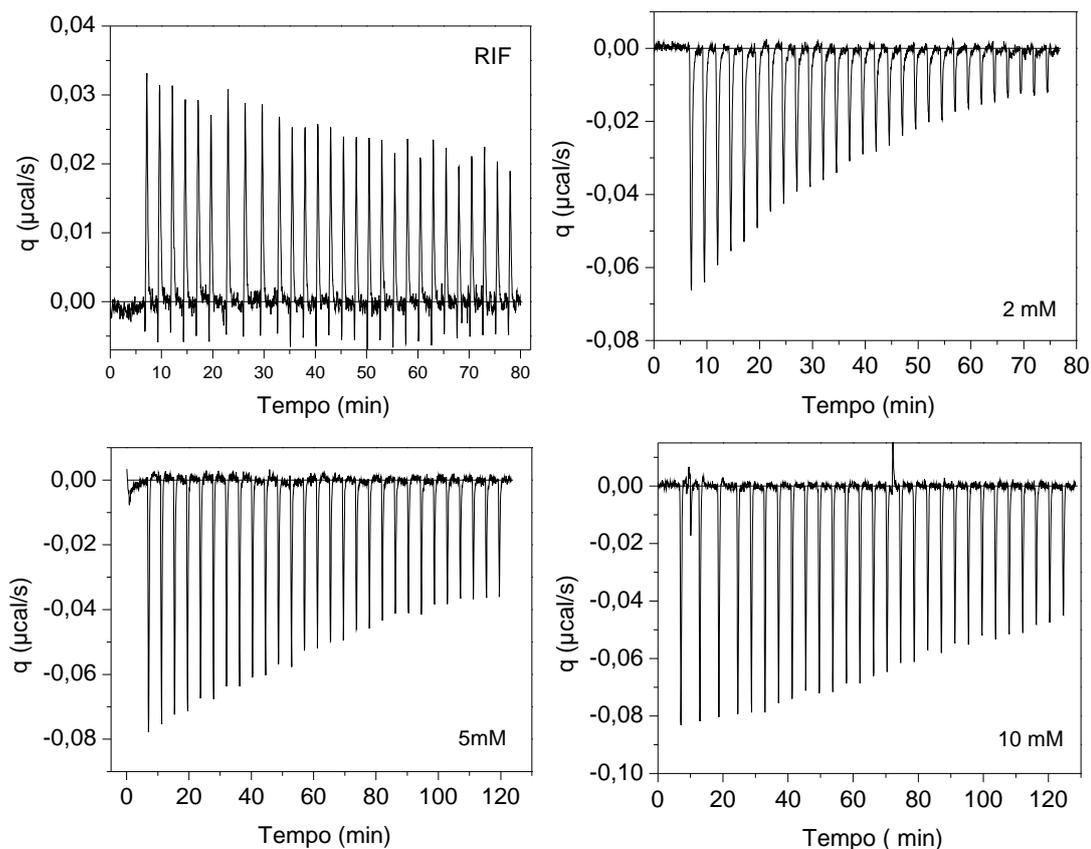


Figura 21: Titulação de POPC a diferentes concentrações (indicadas nos painéis respetivos) com RIF 200 μ M. O painel da esquerda no topo refere-se à adição de RIF a tampão.

No painel no topo à esquerda encontra-se apresentado um termograma típico para a adição de RIF à solução tampão. Observa-se que o calor por injeção é pequeno e não apresenta variações significativas ao longo da titulação. Este resultado indica que à concentração de 200 μ M a RIF se encontra na forma monomérica. A média dos calores obtidos por pico corresponde ao calor de diluição e foi descontado ao calor observado aquando da adição da RIF a soluções contendo POPC.

No painel à direita no topo, está apresentado o termograma correspondente à titulação de uma solução 2 mM de POPC com RIF. Observa-se a libertação de calor, conforme esperado para a associação de RIF à bicamada de POPC. À medida que é adicionada mais RIF o calor libertado diminui significativamente. Esta diminuição pode ser devida a uma diminuição na quantidade de RIF que particiona para a membrana, ou devido a uma diminuição na variação de entalpia devido à interação. Os resultados obtidos segundo o procedimento mais usual (Figura 16) indicam que a redução no calor

libertado se deve à diminuição da quantidade de RIF que associa à membrana em resultado do menor coeficiente de partição para concentrações mais elevadas de RIF. À medida que a concentração de POPC aumenta, a redução no calor libertado ao longo da titulação é menos acentuada pois a concentração de RIF na membrana (bem como na solução aquosa em contacto com esta) é menor.

A média dos calores obtidos devido às duas primeiras adições de RIF encontra-se apresentada na figura 22, painel A, em função da concentração de POPC. Estes resultados foram ajustados com o auxílio das equações (1) a (3), apresentadas no capítulo II, permitindo calcular o coeficiente de partição e a variação de entalpia. No painel B encontram-se apresentados a média dos calores relativos às duas últimas injeções de RIF.

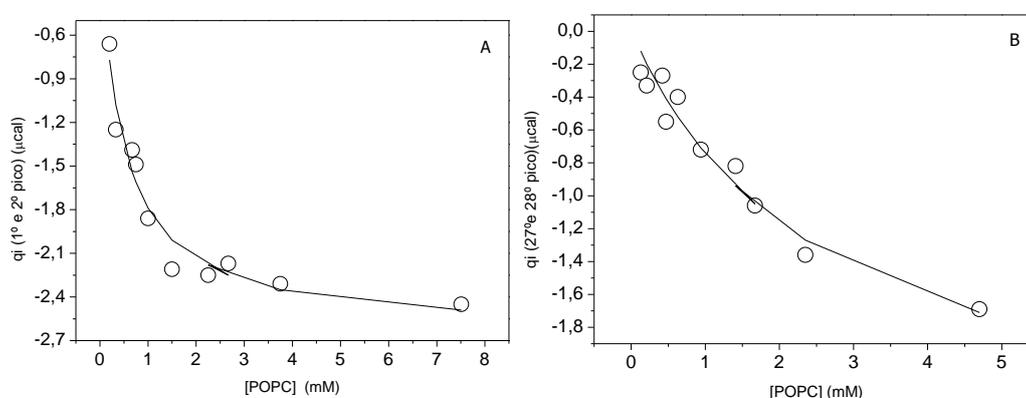


Figura 22: Titulação de POPC a diferentes concentrações com RIF 200 μ M. Painel A: Calor gerado na titulação tendo em conta as duas primeiras injeções. A linha é o melhor ajuste das equações de 1 a 3, $K_p = 5,43 \times 10^3$, $\Delta H = -5,6$ kJ/mol. Painel B: Calor gerado na titulação tendo em conta as duas últimas injeções. A linha é o melhor ajuste das equações de 1 a 3, $K_p = 1,04 \times 10^3$, $\Delta H = -5,5$ kJ/mol

Analisando o gráfico das primeiras injeções podemos observar que o calor gerado é superior quando comparado com as últimas injeções. Este resultado deve-se ao fato de que a titulação não está completa quando são consideradas as últimas injeções de RIF (painel B). Na figura 23, estão representados os valores de K_p^{obs} e $\Delta H^{0,obs}$, obtidos para os diferentes pares de injeções de RIF, em função da concentração total de RIF na célula de ITC (após a 2ª injeção do par considerado).

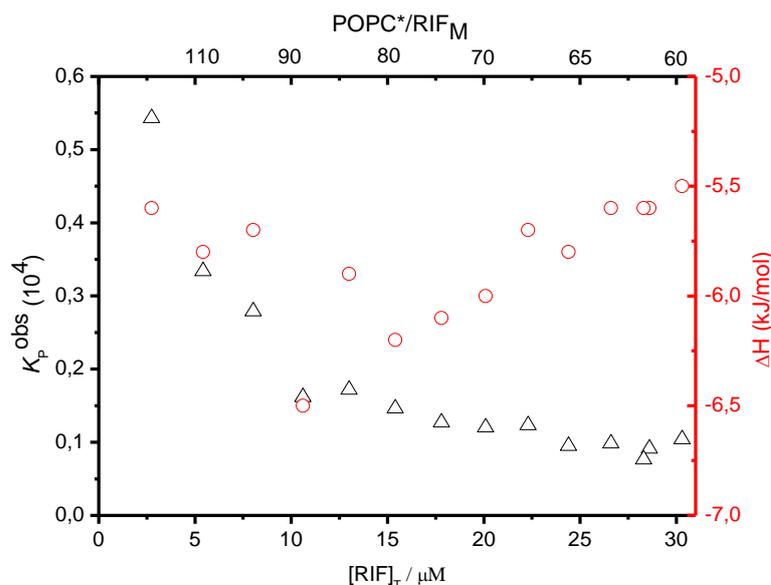


Figura 23: Titulação de POPC a diferentes concentrações com RIF 200 μM. Coeficiente de partição observado (K_p^{obs} , Δ) e variação da entalpia (ΔH , \circ) obtido segundo as equações de 1 a 3.

Observa-se uma diminuição no valor de K_p^{obs} com o aumento na concentração de RIF, tal como verificado seguindo o protocolo usual (figura 16). A variação de entalpia é também muito semelhante ao obtido anteriormente para esta gama de concentrações de RIF. A razão POPC/RIF_M, para uma concentração total de 0,5 mM, encontra-se também apresentada na figura 23. Este parâmetro mostra uma grande variação para concentrações mais baixas de RIF atingindo o valor de 60 para a concentração mais elevada de RIF. A estas baixas concentrações locais de RIF não é necessário efetuar correções para o efeito eletrostático.

III.4.2 Interação da RIF com bicamadas lipídicas representativas de membranas bacterianas

Uma vez que a RIF é um antibiótico bactericida que atua na inibição do RNA polimerase dependente do DNA em células procariotas, foi útil estudar a interação da RIF com bicamadas lipídicas que mimetizam as membranas de seres procariontes.

Ao contrário das membranas de seres eucariontes em que o POPC é o fosfolípido mais abundante, nas membranas de seres procariontes, bactérias, o principal fosfolípido é o POPE com uma também grande percentagem de POPG.

Embora o POPC não seja um fosfolípido abundante neste tipo de membranas mas sendo um fosfolípido estrutural, decidiu-se manter uma percentagem significativa nesta mistura lipídica. Logo a composição lipídica utilizada para mimetizar esta membrana foi PE:PC:PG (50/30/20 % molar).

Da mesma forma que foi estudada a interação da RIF com POPC em relação à dependência do coeficiente de partição com a concentração total de RIF, também para esta mistura lipídica essa dependência foi estudada. Para esta mistura lipídica começou-se por utilizar o protocolo usual para obter a partição da RIF, varias adições de lípido a uma solução de RIF. A figura 24 mostra resultados típicos obtidos para a titulação de uma solução de RIF 20 μM por adições de pequenos volumes de uma solução POPC 30 mM. Foi efetuado o melhor ajuste com as equações (1) a (3), conduzindo aos valores de K_P^{obs} e ΔH° indicados na legenda da figura. No entanto, a variação do calor em função da concentração de lípido é quase linear e não é atingido um patamar, conduzindo a uma grande incerteza associada aos parâmetros. Apesar desta incerteza é possível afirmar que o coeficiente de partição da RIF para esta mistura lipídica é muito inferior ao verificado para o POPC.

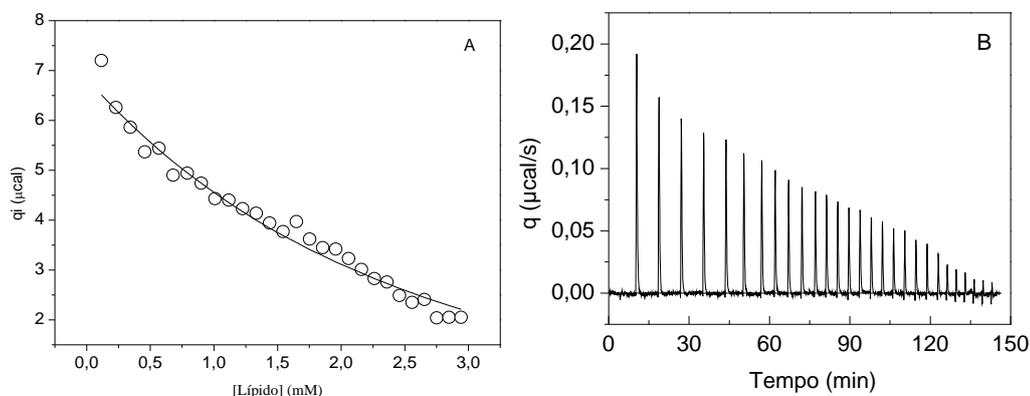


Figura 24: Titulação de RIF com diferentes concentrações com mistura lipídica ternária 30mM. Curva da titulação obtida para uma $[\text{RIF}]_T$ de 20 μM . A linha é o melhor ajuste obtido pelas equações de 1 a 3, a 25 $^\circ\text{C}$, $\gamma = 0,5$; $K_P^{\text{obs}} = 6,6 \times 10^2$, $\Delta H^\circ = 33,8 \text{ kJ/mol}$.

Em relação à variação de entalpia é visível que a interação da RIF com esta membrana é endotérmica, ou seja o $\Delta H > 0$, que neste caso tem um valor de 33,8 kJ/mol.

Dado ao fato de se ter obtido um coeficiente de partição baixo foi necessário utilizar o método de adição de RIF ao lípido que como já referido permite usar concentrações de lípido superiores. Foram elaboradas 6 titulações com diferentes

concentrações de lípido, entre 1 mM e 30 mM, e uma concentração de RIF de 200 μ M. Algumas das titulações realizadas encontram-se apresentadas na figura 25. O primeiro termograma apresentado é referente ao calor de diluição da RIF.

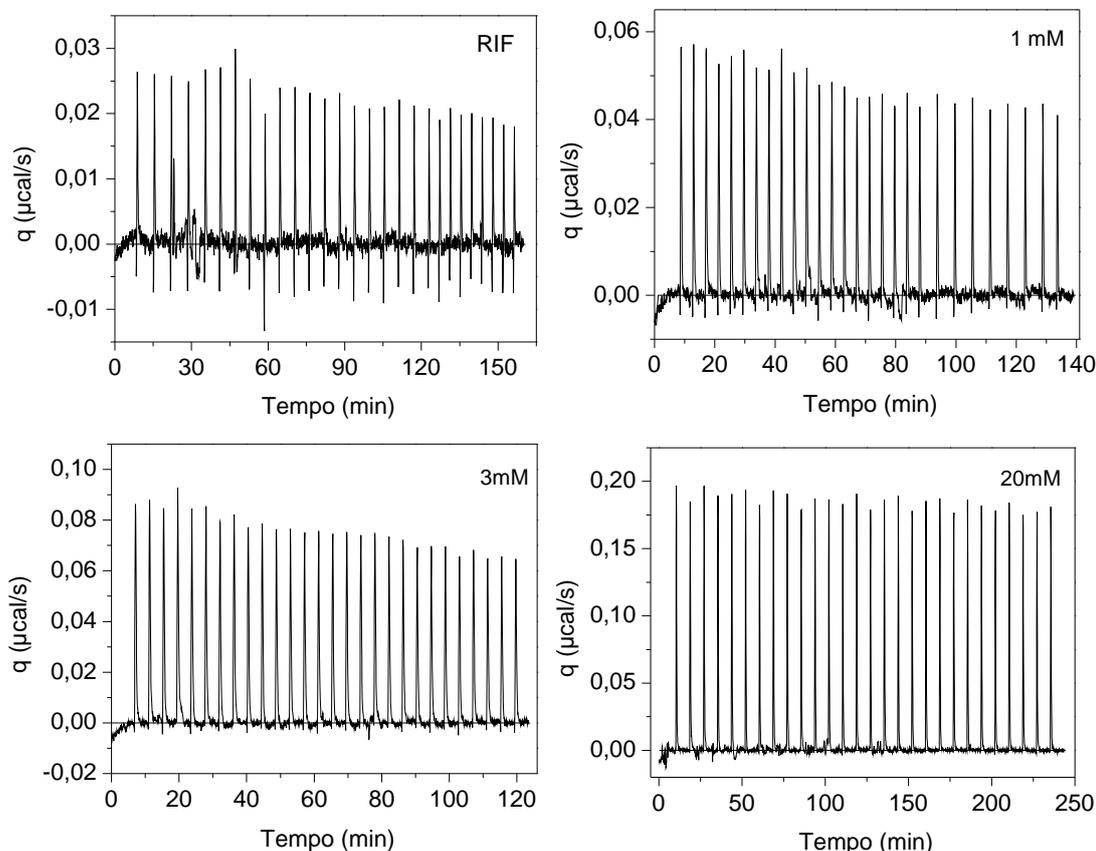


Figura 25: Titulação da mistura lipídica a diferentes concentrações (indicadas nos painéis respetivos) com RIF 200 μ M. O painel da esquerda no topo refere-se à adição de RIF a tampão

Tal como para a membrana de POPC também aqui o calor de diluição da RIF foi descontada aos calores obtidos devido à adição de RIF aos lipossomas.

Segundo as titulações apresentadas e analisando globalmente as titulações, é notória que a variação do calor gerado ao longo de cada titulação é geralmente baixa. Tal como na membrana de POPC também nesta membrana a titulação com a concentração de lípido mais baixa mostra uma variação do sinal mais significativa, muito embora menos acentuada, entre a primeira e a última injeção. Este resultado antecipa um valor de K_P^{obs} pouco dependente da concentração de RIF na gama estudada. A variação do calor em função da concentração de lípido encontra-se representada na figura 26 para o caso das duas primeiras e duas últimas injeções de RIF. É evidente a semelhança entre os

resultados apresentados nos dois painéis, conduzindo a valores muito semelhantes de K_P^{obs} e ΔH^0 , figura 27.

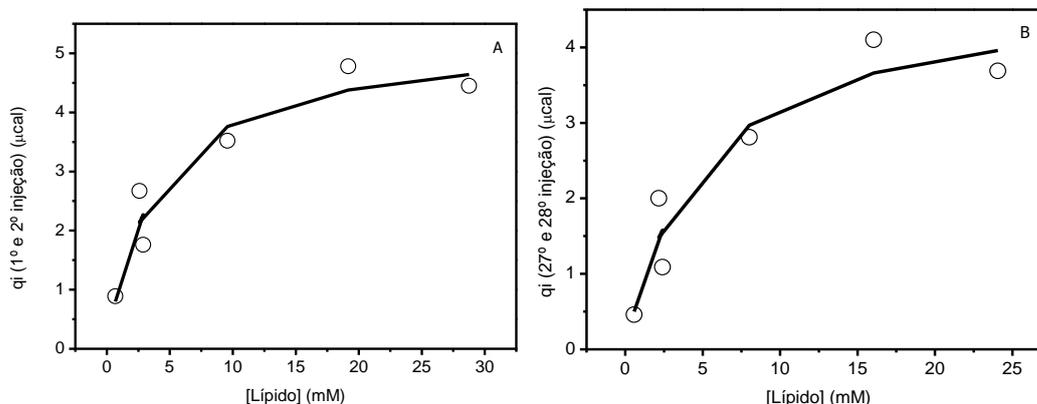


Figura 26: Titulação de PE:PC:PG a diferentes concentrações com RIF 200 μM . Gráfico A: Calor gerado na titulação tendo em conta as duas primeiras injeções. A linha é o melhor ajuste das equações de 1 a 3, $K_P = 6,4 \times 10^2$, $\Delta H = 11,16 \text{ kJ/mol}$ Gráfico B: Calor gerado na titulação tendo em conta as duas últimas injeções. A linha é o melhor ajuste das equações de 1 a 3, $K_P = 5,7 \times 10^2$, $\Delta H = 9,8 \text{ kJ/mol}$

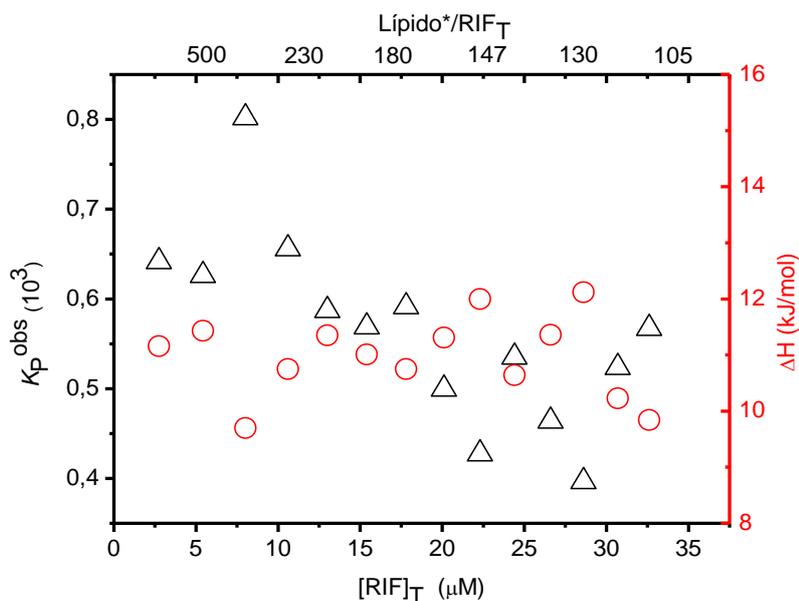


Figura 27: Titulação da mistura lipídica a diferentes concentrações com RIF 200 μM . Coeficiente de partição observado (K_P^{obs} , Δ) e variação da entalpia (ΔH , \circ) obtido segundo as equações de 1 a 3.

Segundo os resultados apresentados é possível observar que para a gama de concentrações utilizadas o coeficiente de partição observado não é muito dependente da concentração total de RIF, variando menos que um fator de 2 vezes, o que era já

antecipado tendo em conta os calores gerados nos primeiros e últimos picos da adição de RIF à membrana.

A variação de entalpia para esta mistura lipídica é positiva, apresentando valores entre 9 e 14 kJ/mol, ao contrário do que foi observado para a membrana composta por POPC, em tampão Trizma.

Em relação à [RIF] local tendo em conta o rácio lípido:RIF na 1^o injeção estes mostram uma diminuição mais abrupta, tal como na membrana de POPC, entre concentrações de [RIF]_T de 5 e 10 µM, sendo que depois segue uma tendência de diminuição menos acentuada. Comparando com os resultados obtidos para a membrana de POPC, os rácios obtidos para esta membrana mostram valores superiores o que se deve ao menor coeficiente de partição, e conduz a uma [RIF]_M muito mais baixa.

Dado à natureza da mistura lipídica vários são os fatores que podem influenciar a baixa partição da RIF e por conseguinte a baixa [RIF]_M. O primeiro fator a ter em conta é o potencial negativo à superfície da membrana, proveniente da carga do PG. Esta carga negativa pode provocar repulsão à RIF dificultando a partição. Para a força iónica utilizada, 20 % de PG conduz a um Ψ_0 igual a -13 mV. Segundo a equação (6), este potencial pode conduzir a uma diminuição no valor de K_P^{obs} até um máximo de 40% (para uma carga de -1 no ligando). Esta diminuição é muito inferior ao observado no valor de K_P^{obs} para esta mistura lipídica em comparação com membranas de POPC puro (uma diminuição de uma ordem de grandeza).

Uma outra possível razão, e talvez a mais significativa, prende-se com as propriedades estruturais da membrana. O principal componente, POPE, apresenta uma temperatura de transição de fase gel/líquido igual a 25°C¹⁶, enquanto a temperatura de transição de fase para o POPG¹⁹ e POPC¹⁷ é igual a -2 °C. À temperatura das experiências, 25°C, a membrana de POPC puro encontra-se completamente na fase fluída enquanto a mistura ternária se encontra próximo da temperatura de transição de fase gel/fluido. É assim de esperar uma maior ordem na membrana da mistura ternária que pode dificultar a partição da RIF. Para além disso o POPE devido ao seu grupo polar ser uma amina primária está capacitado para fazer ligações por ponte de hidrogénio, entre PE's adjacentes e com outras moléculas. Também o PG tem capacidade para fazer essas ligações, muito embora devido à sua carga global negativa tem mais tendência a estabelecer ligações por hidrogénio com outras moléculas. O PC dado ao seu grupo polar não consegue realizar esse tipo de ligações, uma vez que só possui grupos aceitantes em

ligações de hidrogénio. Devido ao estabelecimento de ligações por ponte de hidrogénio na mistura ternária é de esperar que se forme uma membrana mais compacta do que no caso de membranas de POPC puro. Esta maior coesão entre os lípidos dificulta a associação de solutos com a membrana, como foi verificado para o caso da RIF.

III.5 Perturbação da membrana

III.5.1 Dispersão dinâmica de luz

Os resultados de ITC mostram que para elevadas concentrações totais de RIF ($> 50 \mu\text{M}$) existe perturbação da bicamada de POPC, Figura 18B. Foi assim conveniente averiguar a integridade dos lipossomas nestas condições. Essa análise foi efetuada tanto por dispersão dinâmica da luz, onde foi verificado o diâmetro dos lipossomas como pela velocidade de permeação da CBF, através da espectroscopia de fluorescência.

A dispersão dinâmica de luz é uma técnica não evasiva, capaz de determinar o tamanho das partículas em suspensão. Assim o uso desta técnica permite seguir, através do tamanho das partículas em suspensão, se estão ou não a ocorrer fenómenos que possam destruir a integridade dos lipossomas. Para tal foram analisadas ao longo do trabalho várias amostras de Lípido_RIF com diferentes proporções de modo a perceber que efeito tinha a RIF nessas mesmas membranas.

O efeito da RIF nas propriedades da membrana foi analisado tendo em atenção a concentração total de RIF, bem como a sua concentração local através do rácio lípido:RIF_M calculado a partir do K_P^{obs} e tendo em conta o lípido acessível à RIF (Tabela 5).

Tabela 5: Valores da [RIF]_M e do rácio POPC/RIF_M tendo em conta o K_P otimizado para as amostras de POPC contendo diferentes [RIF]_T.

[POPC] / mM	0,1				
[RIF] _T μM	100	50	40	20	10
[RIF] _M	3,6	2,7	2,3	2,1	1,2
POPC/RIF _M	28	37	44	49	86
K_P^{obs} (10^3)	1,3	1,5	1,6	3	3,5

As curvas de autocorrelações obtidas para as amostras estudadas estão apresentadas na figura 28.

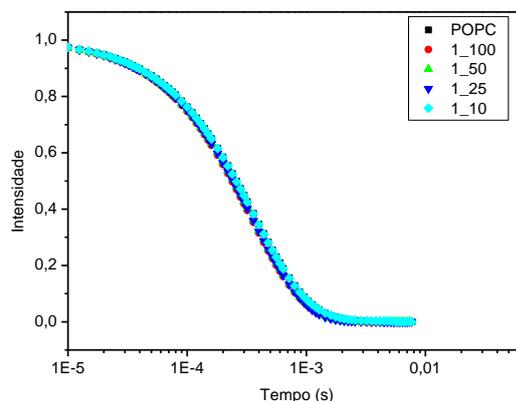


Figura 28: Curvas de autocorrelação normalizadas para as amostras de POPC com diferentes proporções de RIF.

Analisando as curvas de autocorrelação é perceptível que para todas as amostras estudadas a curva de autocorrelação é praticamente idêntica.

Como indicado na introdução, as curvas de autocorrelação conjugadas com a equação de Stokes Einstein permitem obter os valores dos diâmetros hidrodinâmicos das partículas em suspensão assumindo uma forma esférica. Diâmetros hidrodinâmicos que neste caso nos permitem complementar e suportar a ideia de que a RIF não destrói os lipossomas quanto interatua com eles.

A tabela 6, apresenta os resultados obtidos para os diâmetros hidrodinâmicos, para os lipossomas contendo diferentes $[RIF]_T$ a 25°C . O diâmetro médio dos lipossomas é próximo do tamanho do poro dos filtros utilizados na extrusão (100 nm) para todas as amostras, e independente da presença de RIF nas concentrações.

Tabela 6: Diâmetros hidrodinâmicos para os lipossomas de POPC à concentração de 0,1 mM, contendo diferentes $[RIF]_T$ a 25°C .

Rep\Amostra	Unimodal d (nm)				
	POPC	10 μM	20 μM	40 μM	100 μM
1	134,6	125,2	123,1	120,7	127,3
2	127,3	102,5	121,9	121,3	127,5
3	127,0	122,0	120,6	120,5	130,7
Média	129,6	116,6	121,9	120,8	128,5
Desvio padrão	4,3	12,3	1,3	0,4	1,9

Foi estudado para a amostra mais concentrada, com 100 μM se o tempo de incubação alterava a integridade dos lipossomas. Na tabela 7 estão apresentados os diâmetros hidrodinâmicos médios e respetivo desvio padrão. Novamente, observa-se que não ocorrem alterações significativas no tamanho dos lipossomas devido à presença de RIF a uma concentração total de 100 μM . Pode assim concluir-se que para uma concentração de POPC igual ou superior a 0,1 mM, concentrações totais de RIF até 100 μM (que correspondem a rácios POPC:RIF_M superiores a 40) não promovem a desintegração dos lipossomas.

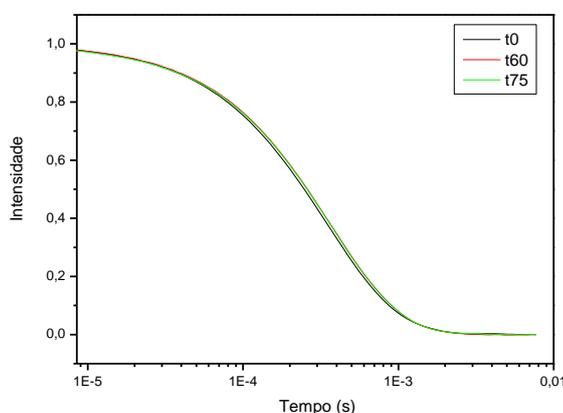


Figura 29: Curvas de autocorrelação para as amostras incubadas a diferentes tempos.

Tabela 7: Diâmetros hidrodinâmicos dos lipossomas contendo RIF 100 μM segundo uma análise unimodal, para diferentes tempos de incubação.

t (min)	0	60	75
Média	124	130	129
Desvio padrão	11	1	1

Do mesmo modo que as membranas de POPC foram levadas a ensaios de DLS, também a membrana com a mistura lipídica ternária foi alvo desses estudos. Nesse sentido e tendo em conta que o procedimento para a outra mistura lipídica tinha sido avaliar o efeito da RIF em diferentes proporções na membrana, para esta mistura lipídica

quisemos avaliar por DLS o que ocorria no ITC. Ou seja, reproduzimos a titulação da RIF com lípido, mas com o auxílio do DLS.

Tendo em conta que o limite mínimo de amostra necessário para a medição no DLS rondava os 2mL preparou-se uma amostra de RIF 20 μ M de 2,872 mL, o dobro do volume da célula do ITC, e titulou-se com 20 μ L de lípido em vez dos 10 μ L usados no ITC.

Os resultados em termos de diâmetros hidrodinâmicos das partículas em suspensão obtidos pela função de auto-correlação conjugada com a equação de Stokes Einstein para os lipossomas de PE:PC:PG contendo diferentes concentrações de RIF a 25°C estão apresentados em baixo, na tabela 8.

Tabela 8: Diâmetros hidrodinâmicos dos lipossomas de PE:PC:PG a diferentes concentrações para uma concentração total de RIF igual a 20 μ M, a 25°C.

[RIF] _T (μ M)	-	20				
[Lípido] (mM)	0,2	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Diâmetro (nm)	128	128	122	119	118	118

Analisando os resultados obtidos é notória uma ligeira diminuição nos diâmetros hidrodinâmicos dos lipossomas. Muito embora essa diminuição não seja significativa para concluir quanto à alteração da integridade dos lipossomas.

III.5.2 Efeito da RIF na cinética de permeação da CBF

Tal como nos ensaios realizados por dispersão dinâmica de luz em que se queria observar se a integridade dos lipossomas é alterada por efeito da RIF, também neste estudo o principal objetivo foi verificar qual o efeito que a RIF tinha na permeação da CBF e se devido a isso afetasse a integridade dos lipossomas.

Nestes ensaios seguidos por fluorescência avaliou-se o efeito de concentrações de RIF nos lipossomas de POPC e da mistura ternária, com 0,1, 0,2 e 0,4 mM.

Dadas as características coradas da RIF, esta absorve ao mesmo comprimento de onda que a CBF conduzindo a uma extinção parcial da fluorescência devido a partilha de luz de excitação.⁵⁰

Sendo a intensidade de fluorescência proporcional à concentração de CBF dentro dos lipossomas, a percentagem máxima de libertação de CBF foi determinada com a adição de TritonX-100 a uma concentração de $100\mu\text{M}$

Tendo em conta essa proporcionalidade o objetivo com estes ensaios de permeação era obter uma constante de velocidade tendo em conta as concentrações locais de RIF utilizadas. Na figura 30 está representada a percentagem de libertação da CBF de lipossomas de POPC às diferentes $[\text{RIF}]_T$ estudadas.

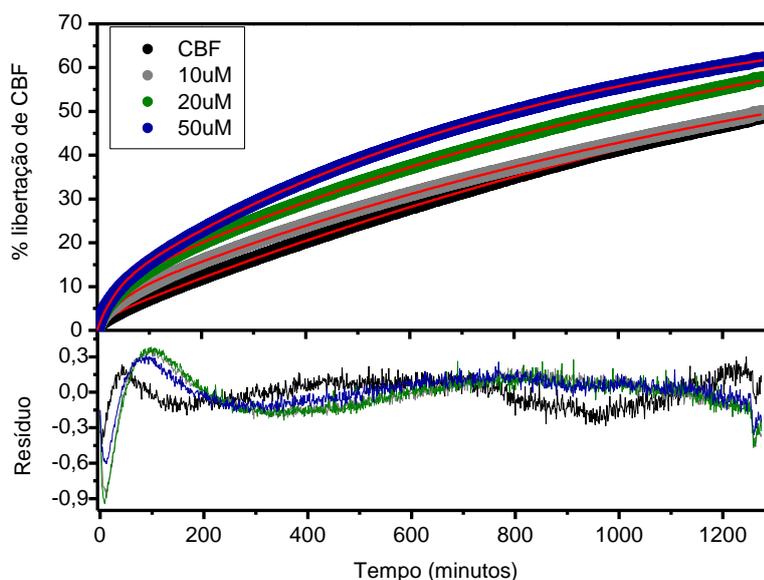


Figura 30: Percentagem de libertação de CBF em membranas de POPC com diferentes concentrações de RIF a 25°C . As curvas estão ajustadas pela equação 16. Resíduo obtido tendo em conta os dados experimentais e os dados ajustados.

Observando os resultados apresentados no gráfico da figura 29, analisando qualitativamente podemos concluir que uma maior concentração de RIF provoca uma permeação mais rápida da CBF. Talvez porque dada a $[\text{RIF}]_T$ a $[\text{RIF}]_M$ vai ser maior provocando uma maior perturbação. Para o gráfico da figura 30 as $[\text{RIF}]_M$ variaram entre $1,2\ \mu\text{M}$ para a $[\text{RIF}]_T = 10\ \mu\text{M}$ e $2,7\ \mu\text{M}$ para a amostra com $[\text{RIF}]_T = 50\ \mu\text{M}$.

Em relação à concentração local de RIF demonstrada através do rácio POPC_RIF_M observa-se que para as concentrações totais de RIF mais elevadas obtêm-se um rácio menor. Para esta membrana de POPC o rácio POPC_RIF_M obtido para $[\text{RIF}]_T = 50\ \mu\text{M}$ foi 37 e em relação à $[\text{RIF}]_T = 10\ \mu\text{M}$ o rácio obtido foi de 86. Se relacionarmos estes resultados com os resultados apresentados na figura 16, podemos observar uma

mesma tendência no comportamento deste rácio ao longo do aumento da concentração de RIF.

A variação temporal na percentagem de CBF libertada (% lib) foi ajustada com uma função tri-exponencial, equação 16, que considera 3 constantes de velocidade distintas para a permeação da CBF através da membrana, uma rápida (k_1), outra média (k_2) e outra lenta (k_3).

$$\% \text{ lib} = a_1(1 - e^{-k_1 t}) + a_2(1 - e^{-k_2 t}) + a_3(1 - e^{-k_3 t}) \quad (16)$$

Ajustando os valores com a ferramenta Solver, foi possível obter as constantes de velocidade de permeação e a distribuição de população, a_1 , a_2 e a_3 tendo em conta a cinética, rápida, média ou lenta, respetivamente. Observando globalmente os resultados de permeação obtidos é possível observar um bom ajuste tendo em conta a equação tri-exponencial. Essa conclusão pode ser corroborada não só visualmente mas pela variação do resíduo. Segundo essa variação que é a diferença dos valores obtidos com os valores ajustados, os resultados mostram uma variação de magnitude de 1,2.

Os gráficos apresentados em baixo dão conta da variação das constantes de velocidade de permeação tendo em conta a $[\text{RIF}]_T$.

Analisando os resultados em relação às cinéticas de permeação considerando os 3 passos distintos, podemos observar que no caso do passo rápido (k_1) os resultados mostram uma diminuição para a amostra com $[\text{POPC}] = 0,1 \text{ mM}$ e salvo a exceção do amostra $[\text{RIF}]_T = 10 \text{ }\mu\text{M}$, as amostras de $[\text{POPC}] = 0,4 \text{ mM}$ apresentam resultados mais baixos pouco dependentes da $[\text{RIF}]_T$. No passo médio observamos um aumento da constante de velocidade para a amostra com $[\text{POPC}] = 0,1 \text{ mM}$ e uma diminuição abrupta entre a amostra sem RIF e a amostra com $[\text{RIF}]_T = 10 \text{ }\mu\text{M}$ para as amostras com $[\text{POPC}] = 0,4 \text{ mM}$. No passo caracterizado como lento em ambas as amostras é possível observar-se um aumento na constante de velocidade em função da $[\text{RIF}]_T$.

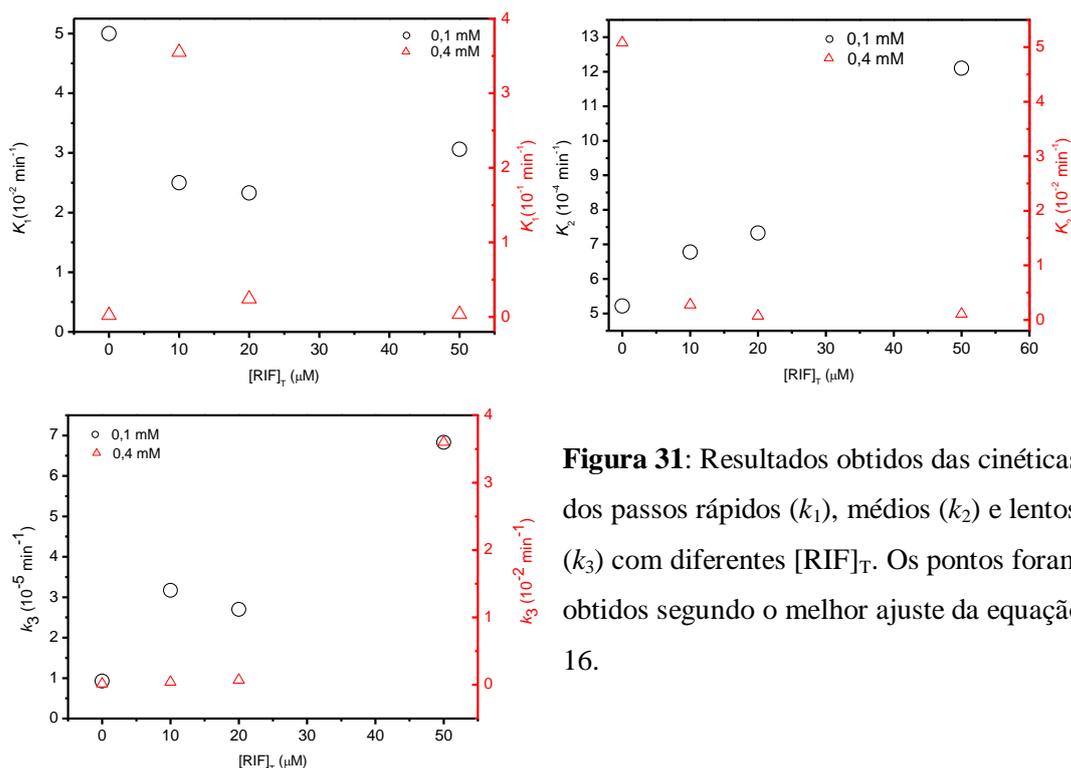


Figura 31: Resultados obtidos das cinéticas dos passos rápidos (k_1), médios (k_2) e lentos (k_3) com diferentes $[RIF]_T$. Os pontos foram obtidos segundo o melhor ajuste da equação 16.

Como dito no início deste subcapítulo as $[RIF]_M$ foram determinadas tendo em conta o K_P^{obs} obtido nos ensaios de ITC. Segundo esses resultados para esta determinou-se o rácio de POPC: RIF_M que para esta composição lipídica variou entre os 37 para $[RIF]_T = 50 \mu\text{M}$ com $[POPC] = 0,1 \text{ mM}$ e os 115 para amostra com $[RIF]_T = 10 \mu\text{M}$ e $[POPC] = 0,4 \text{ mM}$.

Uma vez que não conhecemos adequadamente as cinéticas de permeação da CBF e pelos resultados que obtivemos para as cinéticas e para as distribuições de população não conseguimos obter uma tendência adequada dos resultados, decidimos identificar quatro limites de tempo, 1, 5 10 e 20 horas e analisar a percentagem de CBF que permeia as membranas de POPC.

Os resultados apresentados em baixo fazem correspondência com os gráficos apresentados anteriormente e mostram que um aumento da concentração local de RIF aumenta significativamente a percentagem de libertação de CBF tanto para a mistura lipídica ternária como para a membrana de POPC puro.

A tabela 9 apresenta os resultados referentes à percentagem de libertação de CBF tendo em conta a $[RIF]_T$ a 25°C .

Tabela 9: Percentagens de libertação de CBF de LUVs de POPC 0,1 mM com diferentes $[RIF]_T$ a diferentes tempos.

$RIF_T /$ (POPC_ RIF_M)	% de libertação da CBF				k médio (min^{-1})
	1h	5h	10h	20h	
0	5,1	16,3	28,0	46,1	$5,5 \times 10^{-4}$
10 / 86	7,6	20,1	31,1	47,8	$9,3 \times 10^{-4}$
20 / 49	10,3	25,0	37,2	55,4	$9,4 \times 10^{-4}$
50 / 37	11,7	29,0	43,0	60,3	$1,9 \times 10^{-3}$

Como já tinha sido observado no gráfico de permeação apresentado em cima a amostra de RIF mais concentrada provoca uma permeação da CBF mais rápida do que uma concentração mais baixa.

Da mesma forma também para a mistura lipídica ternária o mesmo procedimento foi realizado, os resultados obtidos encontram-se apresentados na figura 32 e 33 e na tabela 10. Para este sistema, a % de CBF libertada é sempre baixa e os resultados são bem descritos por uma função bi-exponencial. Observa-se uma tendência geral para um aumento nas constantes de velocidade de permeação com o aumento na concentração total de RIF, tanto para uma concentração de POPC igual a 0,1 mM como 0,4 mM. O valor obtido para as constantes de velocidade do passo lento são muito semelhantes para ambas as concentrações de lípido, enquanto a velocidade do passo rápido é significativamente maior para uma concentração de POPC mais baixa.

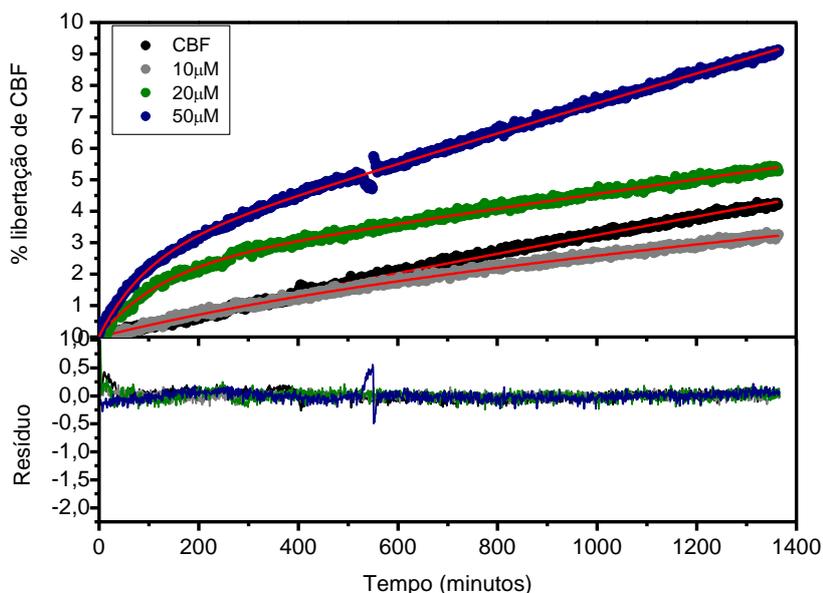


Figura 32: Percentagem de liberação de CBF em membranas de PE:PC:PG com diferentes concentrações de RIF a 25°C. As curvas estão ajustadas por uma equação biexponencial (16). Resíduo obtido tendo em conta os dados experimentais e os dados ajustados.

Quando analisada a % de CBF libertada após intervalos de tempo bem definidos, observa-se que no geral uma maior $[RIF]_T$ nas amostras provoca uma permeação mais rápida da CBF, tabela 10.

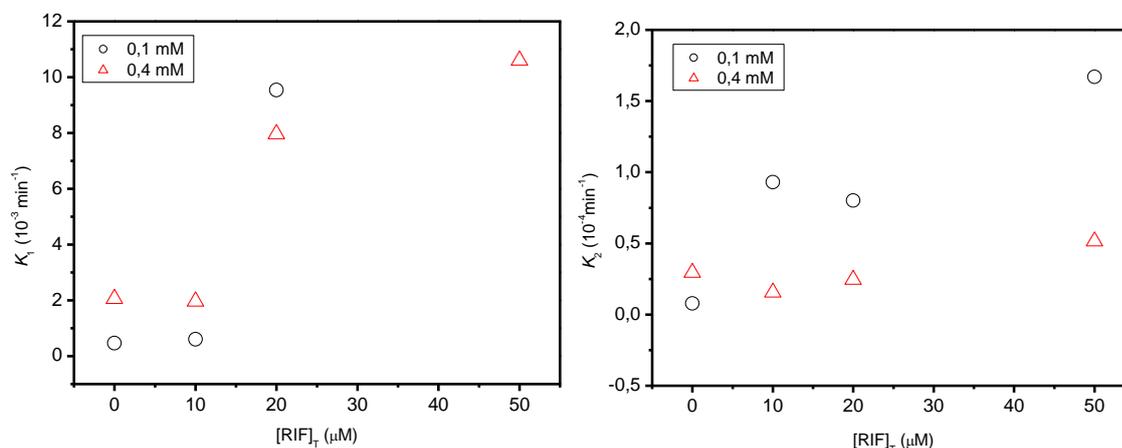


Figura 33: Resultados obtidos das cinéticas dos passos rápidos (k_1) e lentos (k_2) com diferentes $[Lípido]$. Os pontos foram obtidos segundo o melhor ajuste dum função bi-exponencial, equação 16 considerando $a_3=0$.

Segundo os resultados obtidos as constantes de velocidade de permeação são globalmente maiores para a membrana de POPC. Assim sendo e tendo em conta os resultados obtidos para a permeação da CBF, podemos concluir que a permeação da CBF

vai-se alterar de acordo com a composição lipídica dos lipossomas. Como também referido nos resultados do ITC e indicado aquando a introdução aos fosfolípidos, a geometria do POPE é diferente à geometria do PC e do PG, bem como as suas temperaturas de transição gel/fluido no caso do PE. Esta diferença faz com que haja um grau de ordem conformacional, rotacional e translacional elevado no caso das membranas com POPE, que dificulta a permeação da CBF.

Tabela 10: Percentagem de libertação de CFB de LUVs da mistura ternária, 0,4 mM a diferentes $[RIF]_T$ a diferentes tempos.

RIF_T (μM) / (PE:PC:PG_RIF_M)	% de libertação da CBF				
	1h	5h	10h	20h	k médio (min⁻¹)
0	0,3	1,1	2,1	3,8	$2,7 \times 10^{-4}$
10 / 480	0,2	1,0	1,8	2,9	$2,5 \times 10^{-4}$
20 / 284	0,9	2,7	3,5	5,0	$5,1 \times 10^{-3}$
50 / 140	1,6	3,9	5,5	8,4	$3,1 \times 10^{-3}$

Outra possível explicação para a menor velocidade de permeação da CBF através das membranas formadas pela mistura ternária é devido à presença da carga negativa do PG que irá conduzir a uma repulsão entre a CBF (com carga global negativa) e a membrana.

Dadas as conclusões quanto à composição lipídica das membranas, outra conclusão que também pode ser apresentada com a realização destes é o efeito da concentração local da RIF no efeito da libertação da CBF. Analisando os resultados obtidos para as duas misturas lipídicas tendo em conta a concentração de RIF total usada podemos concluir tanto para uma membrana como para outra que maiores concentrações totais de RIF promovem uma permeação da CBF mais rápida.

Capítulo IV

Conclusão

As conclusões que podemos retirar deste trabalho prendem-se com o comportamento que a RIF apresenta quando interage com bicamadas lipídicas de diferentes composições.

Para membranas lipídicas compostas só com POPC o protocolo normalmente usado para determinar o coeficiente de partição observado adequa-se relativamente bem. Isto é, a dependência do coeficiente de partição com a concentração total de ligando ou com o rácio de ligando ligado ao lípido segue no mesmo sentido. Concentrações totais ou locais de RIF mais baixas favorecem uma melhor interação e por conseguinte uma partição mais favorável do ligando para os lipossomas. Concentrações mais baixas de ligando conduzem a curvas de titulação melhor descritas por um modelo de partição simples e a uma menor perturbação da membrana.

Observa-se uma alteração no estado de ionização da RIF quando particiona entre a fase aquosa e bicamadas de POPC, com a desprotonação parcial do grupo piperazina adquirindo uma carga global negativa.

Analisando a correção ao efeito electrostático através da teoria de Gouy-Chapman, podemos concluir que a diminuição da partição observada a elevadas concentrações de RIF não se deve apenas a efeitos electrostáticos.

Em termos da partição para bicamadas lipídicas composta pela mistura ternária, que mimetiza membranas bacterianas, podemos concluir que o protocolo normalmente usado de titulação do ligando com pequenas quantidades de lípido não se adequa a este tipo de sistema, uma vez que o coeficiente de partição é baixo e não é possível atingir concentrações de lípido correspondentes a uma fração significativa de ligando associado à membrana. Desse modo, o modelo da titulação onde a RIF foi adicionada ao lípido foi mostrou ser mais eficiente, apresentado resultados para o coeficiente de partição relativamente baixos, quando comparando com os obtidos para a membrana de POPC.

A partição menos eficiente da RIF para as membranas com a mistura lipídica ternária pode ser devida à repulsão eletrostática entre a RIF e o POPG, e principalmente devido à maior coesão entre os lípidos nesta mistura consequência da formação de ligações por ponte de hidrogénio entre os lípidos e à elevada temperatura de transição de fase do POPE.

Analisando as possíveis alterações, em termos estruturais, que a RIF pudesse provocar nas membranas tendo em conta a análise do tamanho das partículas, verificamos que a interação da RIF com as bicamadas com as duas composições lipídicas distintas não altera significativamente o tamanho das partículas em suspensão. No entanto, a

associação da RIF à membrana conduz a um aumento na velocidade de permeação de pequenas moléculas encapsuladas nos lipossomas como foi observado para o caso da CBF. O aumento na velocidade de permeação é tanto mais elevado quanto maior a concentração de RIF na gama estudada. A permeação da CBF é mais rápida no caso de membranas de POPC do que para membranas compostas pela mistura ternária, observando-se igualmente uma maior velocidade de permeação através das membranas de POPC na presença de RIF. No entanto, quando calculada a razão entre velocidade de permeação na presença e ausência de RIF, observa-se um efeito mais acentuado no caso das membranas formadas pela mistura ternária (~2 e ~ 5 vezes, ao fim de 1 h com 50 μ M RIF e 0,1 mM lípido para POPC e PE:PC:PG, respetivamente). Este resultado contrasta com as concentrações locais de RIF na membrana que são muito menores no caso da mistura ternária ($Lípido_RIF_M = 37$ e 140 para o POPC e a mistura POPE:POPC:POPG, respetivamente) e sugerem uma maior perturbação da membrana para esta mistura.

Capítulo V

Bibliografía

- (1) Loura, Luís M. S., Almeida, Rodrigo, F. M. *Tópicos de Biofísica de Membranas*; Lidel, Ed.; Lisbon, 2004.
- (2) Mouritsen, O. G. *Life — As a Matter of Fat: The Emerging Science of Lipidomics*, 1^a.; The Frontiers Collection; Springer-Verlag: Berlin/Heidelberg/NewYork, 2005.
- (3) Vaz, W. L. C. *Wiley Encycl. Chem. Biol.* **2008**, 1–16.
- (4) Stillwell, W. *An Introduction to Biological Membranes: From Bilayers to Rafts*; Elsevier B.V.: Indianapolis, 2013.
- (5) Gorter, M.D., G. F. *J. Exp. Med.* **1925**, 41 (4), 439–443.
- (6) Robertson, J. D. *Biochem. Soc. Symp.* **1959**, 16, 3–43.
- (7) Watson, H. *Essays Biochem* **2015**, 59 (10), 43–70.
- (8) Voet, Donald. Voet, J. G. *Biochemistry*, 4th ed.; Wiley, J., Ed.; Kaye Pace, 2011.
- (9) Uran, S.; Larsen, a; Jacobsen, P. B.; Skotland, T. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* **2001**, 758 (2), 265–275.
- (10) Dowhan, W. *Annu. Rev. Biochem.* **1997**, 66 (1), 199–232.
- (11) Tanford, C.; Wiley, J. *J. Chem. Educ.* **1980**, 232.
- (12) Israelachvili, J. N.; Mitchell, D. J.; Ninham, B. W. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* **1976**, 72, 1525.
- (13) Wieslander, A.; Christiansson, A.; Rilfors, L.; Lindblom, G. *Biochemistry* **1980**, 19 (16), 3650–3655.
- (14) Murzyn, K.; Róg, T.; Pasenkiewicz-Gierula, M. *Biophys. J.* **2005**, 88 (2), 1091–1103.
- (15) Urbina, J. A.; Moreno, B.; Arnold, W.; Taron, C. H.; Orlean, P.; Oldfield, E. *Biophys J* **1998**, 75 (3), 1372–1383.
- (16) Huang, C. H.; Li, S. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* **1999**, 1422 (3), 273–307.
- (17) Avanti Polar Lipids Inc. **2016**, 28, 13–14.
- (18) McIntosh, T. J. *Chem. Phys. Lipids* **1996**, 81 (2), 117–131.
- (19) Borle, F.; Seelig, J. *Chemistry and Physics of Lipids*,. Elsevier Scientific Publishers: Basel 1985, pp 263–283.
- (20) Ana Maria Branco Alves; Coimbra, U. De. **2013**, 100.
- (21) London, E. *Q. Rev. Biol.* **1989**, 64 (4), 487–488.
- (22) Riaz, M. *Pak. J. Pharm. Sci.* **1996**, 9 (1), 65–77.
- (23) Zawada, Z. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **2004**, 9 (4A), 603–615.
- (24) Bally, M. B.; Hope, M. J.; Webb, G.; Cullis, P. R. *Biochim. Biophys. Acta* **1985**,

- 812, 55–65.
- (25) Agmo Hernández, V.; Karlsson, G.; Edwards, K. *Langmuir* **2011**, *27* (8), 4873–4883.
- (26) Moreno, M. J.; Bastos, M.; Velazquez-Campoy, A. *Anal. Biochem.* **2010**, *399* (1), 44–47.
- (27) Cardoso, R. M. S.; Filipe, H. A. L.; Gomes, F.; Moreira, N. D.; Vaz, W. L. C.; Moreno, M. J. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114* (49), 16337–16346.
- (28) Eyer, K.; Paech, F.; Schuler, F.; Kuhn, P.; Kissner, R.; Belli, S.; Dittrich, P. S.; Krämer, S. D. *J. Control. Release* **2014**, *173* (1), 102–109.
- (29) Heerklotz, H. *Q. Rev. Biophys.* **2008**, *41* (3–4), 205.
- (30) Gallo, G. G.; Radaelli, P. *Anal. Profiles Drug Subst.* **1976**, *5*, 467–513.
- (31) Agrawal, S.; Ashokraj, Y.; Bharatam, P. V.; Pillai, O.; Panchagnula, R. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2004**, *22* (2–3), 127–144.
- (32) Aristoff, P. A.; Garcia, G. A.; Kirchhoff, P. D.; Hollis Showalter, H. D. *Tuberculosis* **2010**, *90* (2), 94–118.
- (33) Sosa, M.; Széliga, M. E.; Fernández, A.; Bregni, C. *Ars Pharm.* **2005**, *46* (4), 353–364.
- (34) Lin, J. H.; Lu, A. Y. *Pharmacol. Rev.* **1997**, *49* (4), 403–449.
- (35) Acocella, G. *Clin. Pharmacokinet.* **1978**, *3* (2), 108–127.
- (36) Seydel, J. K.; Schaper, K. J. *Pharmacol. Ther.* **1982**, *15* (2), 131–182.
- (37) Furesz, S.; Scotti, R.; Pallanza, R.; Mapelli, E. *Arzneimittelforschung.* **1967**, *17* (5), 534–537.
- (38) Maggi, N.; Furesz, S.; Pallanza, R.; Pelizza, G. *Arzneimittelforschung.* **1969**, *19* (4), 651–654.
- (39) Campbell, E. a. E. A.; Korzheva, N.; Mustaev, A.; Murakami, K.; Nair, S.; Goldfarb, A.; Darst, S. A. S. a. *Cell* **2001**, *104* (6), 901–912.
- (40) Hayakawa, E.; Tokumasu, F.; Nardone, G. a; Jin, A. J.; Hackley, V. A.; Dvorak, J. a. *Biophys. J.* **2007**, *93* (11), 4018–4030.
- (41) BARTLETT, G. R. *J. Biol. Chem.* **1959**, *234* (3), 466–468.
- (42) Patrícia Alexandra Teles Martins. *Passive Permeation Across The Blood-Brains Barrier*; 2013.
- (43) Draczkowski, P.; Matosiuk, D.; Jozwiak, K. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *87*, 313–325.
- (44) Velazquez-Campoy, A.; Freire, E. *Nat. Protoc.* **2006**, *1* (1), 186–191.

- (45) Tsamaloukas, A. D.; Keller, S.; Heerklotz, H. *Nat. Protoc.* **2007**, 2 (3), 695–704.
- (46) Filipe, H. A. L.; Coreta-Gomes, F. M.; Velazquez-Campoy, A.; Almeida, A. R.; Peixoto, A. F.; Pereira, M. M.; Vaz, W. L. C.; Moreno, M. J. *J. Phys. Chem. B* **2013**, 117 (13), 3439–3448.
- (47) Tan, A.; Ziegler, A.; Steinbauer, B.; Seelig, J. *Biophys. J.* **2002**, 83 (3), 1547–1556.
- (48) Daniel C. Harris. *Quantitative Chemical Analysis 7th*; Freeman & Company, W. H., 2006.
- (49) Pereira-Leite, C.; Carneiro, C.; Soares, J. X.; Afonso, C.; Nunes, C.; L??cio, M.; Reis, S. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2013**, 84 (1), 183–191.
- (50) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy Principles of Fluorescence Spectroscopy*; 2006.
- (51) Aschi, M.; Archivio, A. a D.; Fontana, A.; Formiglio, A. *J Org Chem* **2008**, 73 (3), 3411–3417.
- (52) Barbet, J.; Machy, P.; Truneh, A.; Leserman, L. D. *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, 772 (3), 347–356.
- (53) Squire, R. A.; Brown, C. C.; Smith, J. M. **1977**, 3 (February), 489–492.
- (54) Coreta-Gomes, F. M.; Martins, P. a. T.; Velazquez-Campoy, A.; Vaz, W. L. C.; Geraldés, C. F. G.; Moreno, M. J. *Langmuir* **2015**, 31 (33), 9097–9104.
- (55) Goldberg, R. N.; Kishore, N.; Lennen, R. M. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **2002**, 31 (2), 231–370.
- (56) Kemmer, G.; Keller, S. *Nat. Protoc.* **2010**, 5 (2), 267–281.
- (57) McIntyre, J. C.; Sleight, R. G. *Biochemistry* **1991**, 30 (51), 11819–11827.
- (58) Moreno, M. J.; Estronca, L. M. B. B.; Vaz, W. L. C. *Biophys. J.* **2006**, 91 (3), 873–881.
- (59) Cardoso, R. M. S.; Martins, P. A. T.; Gomes, F.; Doktorovova, S.; Vaz, W. L. C.; Moreno, M. J. *J. Phys. Chem. B* **2011**, 115 (33), 10098–10108.
- (60) Bastos, M. *Biocalorimetry. Foundations and Contemporary Approaches.*; Group, T. & F., Ed.
- (61) Moreno, M. J.; Bastos, M.; Velazquez-Campoy, A. *Anal. Biochem.* **2010**, 399 (1), 44–47.
- (62) Sampaio, J. L.; Moreno, M. J.; Vaz, W. L. C. *Biophys. J.* **2005**, 88 (6), 4064–4071.