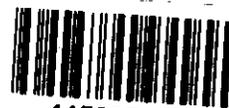




**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE FÍSICO-QUÍMICA**



1150052484



T/UNICAMP B497e

**" Estudos sobre o antineoplásico CPT-11:
I. Interação com albumina de soro humano (HSA);
II. Encapsulação e caracterização de CPT-11 em
lipossomas estericamente estabilizados. "**

TESE DE DOUTORADO

Débora Nakai Biloti

Orientador: Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine (IQ/UNICAMP)

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana (FEQ/UNICAMP)

Bolsa: FAPESP (98/00556-7)

Campinas - SP

Julho - 2002

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL**

| | |
|------------|-------------------------------------|
| UNIDADE | <u>ICA 1244</u> |
| Nº CHAMADA | <u>UNICAMP</u> |
| | <u>B 4972</u> |
| V | EX |
| TOMBO BC/ | <u>52484</u> |
| PROC. | <u>124103</u> |
| C | <input type="checkbox"/> |
| D | <input checked="" type="checkbox"/> |
| PREÇO | <u>R\$ 11,00</u> |
| DATA | |
| Nº CPD | |

CM00179851-9

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP**

BIB 10 241982

~~B4926~~

B 4972

Biloti, Débora Nakai

**Estudos sobre o antineoplásico CPT- 11:
I. Integração com albumina de soro humano
(HSA); II. Encapsulamento e caracterização
de CPT-11 em lipossomas estericamente
estabilizados / Débora Nakai Biloti. --
Campinas, SP: [s.n], 2002.**

Orientador: Francisco B. T. Pessine.

Co-orientadora: Maria Helena A. Santana.

**Tese (doutorado) – Universidade
Estadual de Campinas, Instituto de Química.**

**1. Antineoplásico CPT-11. 2. Lipossomas.
3. Albumina .4. Fluorescência. I. Pessine,
Francisco B. T. II. Santana, Maria Helena A.
III. Universidade Estadual de Campinas.
IV. Título.**

A Deus,

Ao meu protetor,

A meus queridos pais, Toki e Sayoko,

À minha carinhosa irmã, Sandra,

Ao meu amor, Ricardo.

Agradecimentos

Muitas pessoas e instituições me ajudaram durante toda a minha caminhada, e, sem elas, dificilmente teria chegado aqui.

Ao Prof. Francisco B. T. Pessine, pela amizade, dedicação e paciência em me orientar. Obrigada por me ensinar o fantástico mundo da fluorescência. E sua contribuição foi vital em minha formação, como Mestre e Doutora. Muito obrigada!

À Profa. Maria Helena Andrade Santana (FEQ/UNICAMP), pela excelente co-orientação e por ser a minha fonte de incentivo, inspiração, conhecimento, motivação e energias positivas.

Ao meu esposo Ricardo, por ser uma pessoa maravilhosa, compreensível, amorosa e divertida. Obrigada por me ajudar a entender a Matemática da quimiometria, por programar as rotinas de quimiometria e por gerenciar perfeitamente a minha máquina Lírío com o mundo do software livre.

Ao pessoal do laboratório e da salinha: Cláudio, Edeílza, Kesley, Melissa, Milene, Neife, Rita, Robson e Sílvia, pelo apoio, amizade e colaboração (e brincadeiras, é claro).

À Sílvia Lucas F. da Silva (IQ/UNICAMP), pela colaboração no trabalho de HSA, pela ajuda nos testes de condutividade e por sempre me apoiar nos momentos difíceis e compartilhar os momentos alegres.

Ao pessoal da FEQ: Elaine, Maria Heleninha, Giuliana, Heron, Paulo de Tarso, Fernanda e Gilson.

À Elaine C. M. Cabral (FEQ/UNICAMP), por sempre me ajudar a resolver os problemas "lipossomais".

Aos meus amigos do IMECC e redondezas: Ricardo, Valéria e Tomás, Sérgio, Lúcio, Cantão e Luiza, Gal e Denise, pela amizade e momentos divertidos.

Ao Prof. Nelson Duran Caballero, pelo uso de equipamentos, pela disposição em ajudar e pela motivação em fazer pesquisa.

Ao Prof. Carlos Roque Duarte Correia (IQ/UNICAMP) e seus alunos Paulo de Tarso Hennies e Ângelo Henrique de Lira Machado, pela purificação de DMPE-PEG e DSPE-PEG, através de cromatografia flash.

Ao Dr. Carlos Ramos (BFM/LNLS) e ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), pela orientação no uso e interpretação dos espectros de dicroísmo circular, bem como toda a infraestrutura do Laboratório.

À Profa. Márcia M. C. Ferreira e ao Marlon M. dos Reis, pelo tratamento quimiométrico dos meus dados e pela colaboração nos nossos trabalhos.

À Profa. Anita J. Marsaioli e Marisa Alves Nogueira, por trabalharmos juntas na patente de dibenzoilmetanos e por conseguirmos o prêmio de Menção Honrosa.

Ao Prof. Amando S. Ito (IF/USP), pelo uso dos fluorímetros e pela colaboração no nosso trabalho.

Aos professores Eneida de Paula (IB/UNICAMP), Inés Joekes (IQ/UNICAMP), Ronei J. Poppi (IQ/UNICAMP) e Rogério Custódio (IQ/UNICAMP), pelo apoio, compreensão e sugestões ao nosso trabalho.

Ao Prof. Luiz Carlos Dias (IQ/UNICAMP) e seus alunos, pelo companheirismo e colaboração no laboratório.

Aos professores César Santana (FEQ/UNICAMP), Pedro L. O. Volpe (IQ/UNICAMP), Fernando Galembeck (IQ/UNICAMP), Luzia Koike (IQ/UNICAMP), Lireny A. G. Gonçalves (FEA/UNICAMP) e Carlos F. S. Bonafé (IB/UNICAMP), pelo uso de equipamentos e/ou reagentes.

Aos que não estão mais aqui e que deixam saudades: Reinaldo, Zé Antônio, Lauro, Marilene, Joyce, Claudete e D. Iara (que Deus a tenha).

Esta tese não sairia sem a ajuda de pessoas maravilhosas: aos técnicos Cláudia Martelli, Valéria (nosso lab.), Renata, Cássia, Chico Adão, Fabiana, Maria do Carmo, Divino, Márcia (FTIR), Sônia (RMN) e Marcelo; ao pessoal da CPG, Bel, André, Rodrigo e Celi; Neusa (compras); Valdivino (motorista); Sílvia e Paula (importação); Pimpim; Paulão (água); Mário S. Toma; e Paula (xerox).

Aos funcionários das oficinas, vidraria, almoxarifado, marcenaria, manutenção, setor

de limpeza, informática e BIQ.

Ao pessoal do DGA, Pedro e Marcos Zanata, pela importação de reagentes.

Ao Prof. Clemens Posten (Universidade de Karlsruhe, em Karlsruhe, Alemanha) e sua aluna Barbara Kiessling, pelo estágio sobre lipossomas em seu laboratório.

Ao Dr. GianLuigi Devani, à Carla Perera e à empresa Pharmacia & Upjohn, pela doação de CPT-11.

Ao Dr. Peter Hoffmann, à Kellie Skogstrom, e à empresa Genzyme Pharmaceuticals, pela doação de DSPC, DSPE-PEG, DSPG e colesterol. O Dr. Hoffmann nos mandou DSPG sem que pedíssemos, sem saber que DSPG mudaria minha vida. Ou seja, Dr. Hoffmann é o meu anjo da guarda!

À Dra. Terry Allen (University of Alberta, em Edmonton, Canadá), pela disposição e pelas valiosas dicas em nosso trabalho. Sua paixão por lipossomas motivou-me a continuar em frente.

Aos pesquisadores Dr. Sadzuka, Dr. Working, Dr. Underberg, Dr. Verweij, Dr. David Deamer e Dr. Vecer, pela "solidariedade científica".

Aos amigos da União Espírita Antônio Carlos, por trazer-me paz e harmonia, e fazer com que eu sempre acreditasse no impossível.

À minha querida família, pelo carinho, amor, incentivo e apoio, em todos os momentos da minha caminhada.

À FAPESP, pelo suporte financeiro. Sem a FAPESP, este trabalho seria quase impossível.

Ao Instituto de Química/UNICAMP, pela excelente formação acadêmica que me proporcionou, desde a graduação, até hoje, e pela sua infra-estrutura, que tornou possível a realização desta tese.

Curriculum Vitae

I. Formação

- **Doutorado em Ciências – Físico-Química.**

Estudos sobre o antineoplásico CPT-11: I. Interação com albumina de soro humano (HSA); II Encapsulação e caracterização de CPT-11 em lipossomas estericamente estabilizados.

Universidade Estadual de Campinas.

Cidade: Campinas – SP.

Período: Março de 1998 – Julho de 2002.

Órgão financiador: FAPESP (proc. 98/00556-7)

- **Mestrado em Química.**

Estudo sobre o comportamento fotoquímico, frente às radiações ultravioleta UVA, do protetor solar Parsol® 1789, incluído em β -ciclodextrina.

Universidade Estadual de Campinas.

Cidade: Campinas – SP.

Período: Março de 1996 a Março de 1998.

Órgão financiador: CAPES

- **Bacharelado em Química.**

Universidade Estadual de Campinas.

Cidade: Campinas – SP.

Período: Março de 1992 a Dezembro de 1995.

II. Artigos publicados

- M. M. Reis, D. N. Biloti, M. M. C. Ferreira, F. B. T. Pessine, G. M. Teixeira. PARAFAC for Spectra Curve Resolution, a case in study: Total Luminescence of Human Dental Tartar, *Applied Spectroscopy*, 55:55–59 (2001).
- D. N. Biloti, M. M. Reis, M. M. C. Ferreira, F. B. T. Pessine. Photochemical behavior under UVA radiation of β -cyclodextrin included Parsol® 1789 with a chemometric approach, *J. Mol. Struct.*, 480–481:557–561 (1999).
- R. E. Bruns, J. C. Andrade, C. Reis, D. Nakai. Is statistical lack of fit a reliable criterion for chemical complexity?, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 33:159–166 (1996).

III. Trabalhos apresentados em congressos e encontros

- **Encapsulation of CPT-11 in STEALTH® Liposomes: a Tentative Method to Reduce the Rate of Hydrolysis.**
D. N. Biloti, A. S. Ito, M. H. A. Santana and F. B. T. Pessine.
First Mercosur Workshop on Biomembranes.
30 de Novembro a 01 de Dezembro de 2000, Buenos Aires, Argentina.
- **Norfloracin Distribution in Multilamellar Liposomes Studied by Spectrofluorimetry.**
N. L. Zalloum, D. N. Biloti and F. B. T. Pessine.
First Mercosur Workshop on Biomembranes.
30 de Novembro a 01 de Dezembro de 2000, Buenos Aires, Argentina.
- **Photophysical Study of CPT-11 in Human Serum Albumin (HSA) Solution with a Chemometric Approach.**
D. N. Biloti and F. B. T. Pessine.
VI Encontro Latino-Americano de Fotoquímica e Fotobiologia (ELAFOT).
12 a 16 de Setembro de 1999, Teresópolis, RJ.

- **Antibiotic Activity of Commercial UV Blockers and their Chemical and Biotransformed Derivatives.**
M. A. Nogueira, E. G. Magalhães, A. F. Magalhães, F. B. T. Pessine, D. N. Biloti, and A. J. Marsaioli.
2nd IUPAC International Conference on Biodiversity.
11 a 15 de Julho de 1999, Belo Horizonte, MG.
- **Human Dental Calculi Analysis using Total Luminescence.**
M. M. Reis, D. N. Biloti, F. B. T. Pessine and M. M. C. Ferreira.
6th Scandinavian Symposium on Chemometrics.
15 a 19 de Agosto de 1999, Porsgrunn, Norway.
- **Photochemical Behavior under UVA Ultraviolet Radiation, of β -cyclodextrin Included Parsol[®] 1789 Sunscreen.**
D. Nakai, M. M. Reis, F. B. T. Pessine and M. M. C. Ferreira.
XXIV European Congress on Molecular Spectroscopy (EUCMOS).
23–28 de Agosto de 1998, Prague, Czech Republic.
- **Determinação de Molibdênio(VI) em Material Vegetal Usando Misturas Homogêneas de Solventes.**
D. Nakai, J. C. Andrade e C. J. Cuelbas.
VIII Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA).
03 a 06 de Setembro de 1995, Belo Horizonte, MG.
- **É a Falta de Ajuste Estatístico um Critério Confiável para Complexidade Química?**
C. Reis, D. Nakai, R. E. Bruns e J. C. Andrade.
VIII Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA).
03 a 06 de Setembro de 1995, Belo Horizonte, MG.
- **Determinação Espectrofotométrica de Mo(VI) em Material Vegetal.**
D. Nakai, J. C. Andrade e C. J. Cuelbas.
III Congresso Interno de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Campinas.
28 a 31 de Agosto de 1995, Campinas, SP.

- **Estudo Quimiométrico de Misturas Homogêneas de Solventes para a Determinação Simultânea de Ferro(III) e de Cobalto(II) com Tiocianato.**
C. J. Cuelbas, D. Nakai, J. C. Andrade e C. Reis.
VII Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA).
08 a 10 de Setembro de 1993, Rio de Janeiro, RJ.

IV. Estágio

- **Vesicle-Templated Polymer Hollow Spheres.**
Prof. Dr. -Ing. Clemens Posten, Institut für Mechanische Verfahrenstechnik und Mechanik, Universidade de Karlsruhe, Karlsruhe, Alemanha, no período de Janeiro a Fevereiro de 2001.

V. Patente

- **Obtenção de Novos Derivados de Dibenzoilmetano que Apresentam Atividade Antineoplásica e de Aplicação Potencial como Protetores Solares.**
A. J. Marsaioli, A. F. Magalhães, D. N. Biloti, E. G. Magalhães, F. B. T. Pessine, J. E. de Carvalho, L. K. Kohn, M. A. Antonio, M. A. Nogueira.
Patente requerida em 22 de Dezembro de 2000 sob o número 6.583-8.

VI. Prêmio

- **Menção Honrosa do XXVII Concurso "Prêmio Governador do Estado – Invento Brasileiro",** ao invento *Obtenção de Novos Derivados de Dibenzoilmetano que Apresentam Atividade Antineoplásica e de Aplicação Potencial como Protetores Solares* (patente requerida 6.583-8), em 20 de Novembro de 2001.

VII. Cursos

- **Mini-curso de Fundamentos, Instrumentação e Aplicações de Espalhamento de Raios-X a Baixos Ângulos.**

Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, em Campinas, no período de 16 a 17 de Julho de 2001, com carga horária de 16 horas.

- **Microencapsulation of Bioactive Molecules within Liposomes or Emulsions: from the Bench to Production.**

Hotel União, em Caxambu, em 18 de Maio de 2001, sob a coordenação da Dra. Maria Helena Bueno da Costa (Instituto Butantan).

- **Liposomes: Biotechnological Applications.**

Universidad Nacional de Quilmes, em Buenos Aires, Argentina, no período de 27 a 29 de Dezembro de 2000.

- **Mini-curso de Biologia Molecular Estrutural.**

Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, em Campinas, no período de 13 a 17 de Julho de 1998, com carga horária de 40 horas.

- **Curso de Estatística Aplicada ao Controle de Dados Analíticos.**

VIII Encontro Nacional de Química Analítica, em Belo Horizonte, no período de 03 a 06 de Setembro de 1995, com carga horária de 6 horas.

Resumo

Este projeto foi motivado pela expectativa de que medicamentos empregados no tratamento contra o câncer tenham sua eficácia melhorada e seus efeitos colaterais reduzidos quando encapsulados em lipossomas.

A primeira parte do trabalho consistiu no estudo da interação do antineoplásico CPT-11 com a albumina de soro humano (HSA), para avaliar se existe a estabilização de sua forma lactona na presença de HSA e se ocorrem mudanças na estrutura secundária desta proteína, devido à interação com CPT-11, a partir da cinética de hidrólise de CPT-11, monitorada pelos espectros de fluorescência, em diferentes concentrações de HSA. O tratamento quimiométrico dos dados espectroscópicos indicaram que, na presença de HSA em concentração similar à encontrada em condições fisiológicas (30mg/mL), uma nova espécie é formada, devido à rápida complexação entre HSA e a forma lactona, produzindo um espectro diferente se comparado com o da forma lactona livre. Com estes resultados, propusemos um mecanismo de reação entre CPT-11 e HSA. Tal mecanismo só foi possível de ser elucidado via tratamento dos dados com a quimiometria, demonstrando a utilidade desta técnica. Outra conclusão obtida através de quimiometria foi que, na estequiometria 1:1, a albumina não interage com a forma lactona de CPT-11, contradizendo trabalhos existentes na literatura.

A segunda parte do projeto consistiu na preparação e caracterização de lipossomas LUV estericamente estabilizados, produzidos com os lipídios sintéticos DSPC, DSPE-PEG2000, DSPG e colesterol, contendo o fármaco encapsulado. Estudos sobre a cinética de hidrólise de CPT-11 encapsulado, complementados com os estudos sobre a migração de prótons através da bicamada lipídica, monitorada a partir dos espectros de

fluorescência de 9-aminoacridina em várias soluções tampão com diferentes pHs, indicaram que o sistema lipossomal consegue manter o fármaco CPT-11 estável, evitando sua hidrólise em pH fisiológico.

Abstract

This project was motivated by the prospects of both an improvement in the efficacy of anticancer drugs and a reduction in their side effects as a result of being encapsulated in liposomes.

The first part of this work consisted in the study of the interaction between the antineoplastic drug CPT-11 and Human Serum Albumin (HSA), in order to evaluate the stability of the lactone form in the presence of HSA, through the kinetic behavior of CPT-11 hydrolysis. Our study also aimed at verifying whether modifications in the secondary structure of the protein would occur due to its interaction with CPT-11. Both type of experiments were carried out by monitoring the fluorescence spectra of CPT-11 in the presence of different HSA concentrations. A chemometric approach showed that, in a physiological HSA concentration (30mg/mL), a new species is formed, due to the rapid interaction between HSA and CPT-11 lactone form, which has a different spectrum compared to the free lactone one. Based on these results, we proposed a mechanism of reaction between CPT-11 and HSA. The understanding of this mechanism was only possible by using chemometrics, indicating the benefits of this technique. Moreover, chemometrics evidenced that using 1:1 stoichiometry, HSA does not interact with lactone form of CPT-11, contradicting the researches in the literature.

The second part involved the preparation and characterization of LUV sterically stabilized liposomes, with DSPC, DSPE-PEG2000, DSPG and cholesterol, including CPT-11. The kinetic behavior of the hydrolysis of included CPT-11, combined with the study of proton migration through lipid bilayer, according to fluorescence spectra of 9-aminoacridine in different pH buffers, showed that our liposomal system can maintain CPT-11 in a stable form, avoiding its hydrolysis in physiological pH, for a long period of time.

Abreviações

9AA: 9-aminoacridina

9-AC: 9-aminocamptotecina

9-NC: 9-nitrocamptotecina

ΔG : energia livre de Gibbs necessária para transferir uma partícula de uma fase aquosa para uma hidrofóbica

ΔG_B : energia de Born de transferência de um íon ou dipolo da água para um ambiente hidrofóbico com baixa constante dielétrica, tal como o interior de uma bicamada

ΔG_D : energia relacionada a um potencial dipolo interno

ΔG_H : termo hidrofóbico que considera a energia necessária para transferir uma cavidade não-carregada com o tamanho de um átomo ou molécula de soluto individual da água para a bicamada

ΔG_I : energia de imagem, que considera que a membrana é uma fina matéria hidrofóbica cercada por um ambiente aquoso

ΔG_{sp} : contribuições de energia correspondente a interações específicas de uma molécula de soluto tanto com a água quanto com o interior da bicamada

$\Delta \Psi$: potencial de membrana

ΔpH : gradiente de pH

λ_{em} : comprimento de onda de emissão

λ_{exc} : comprimento de onda de excitação

AZT: azido-3'-desoxitimidina

CD: ciclodextrina

CPT: Camptotecina

CPT-11: Irinotecan

CPT-11:LUV: lipossomas LUV estericamente estabilizados, constituídos por lipídios com PEG, contendo CPT-11

D: coeficiente de difusão de uma espécie dentro da membrana

d: espessura da bicamada lipídica

DMPC: dimiristoilfosfatidilcolina

DMPE: dimiristoilfosfatidiletanolamina

DMPE-PEG: dimiristoilfosfatidiletanolamina-PEG

DSPE-PEG: diestearoilfosfatidiletanolamina-PEG

DMPG: dimiristoilfosfatidilglicerol

DSPC: diestearoilfosfatidilcolina

DSPG: diestearoilfosfatidilglicerol

FCCP: p-trifluorometoxifenilhidrazona

HSA: albumina de soro humano (Human Serum Albumin)

HSA:CPT-11: complexo entre HSA e CPT-11

HEPES: N-[2-hidroxi-etil]piperazina-N'-[2-ácido etanosulfônico]

I/I_0 : (ou *Q*) avalia a supressão de fluorescência, onde I_0 é a intensidade de fluorescência inicial e *I* é a intensidade de fluorescência em um dado tempo.

K: coeficiente de partição da espécie permeante entre a água e um hidrocarboneto líquido, correspondente ao interior hidrofóbico da membrana

LUV: lipossomas unilamelares grandes (Large Unilamellar Vesicles)

MES: 2-[N-morfolino] ácido etanosulfônico

m/m: razão massa/massa

MLV: lipossomas multilamelares (Multilamellar Vesicles)

m/v: porcentagem relacionada à massa (em g) em 100mL de água

P: coeficiente de permeabilidade de uma partícula que atravessa a bicamada

PA: ácido fosfatídico

PC: fosfatidilcolina

PE: fosfatidiletanolamina

PEG: polietilenoglicol, com massa molar de 2000g/mol

PG: fosfatidilglicerol

PI: fosfatidilinositol

PS: fosfatidilserina

R: constante dos gases

r: medida de grau de anisotropia de fluorescência no estado estacionário

SN-38: metabólito terapeuticamente ativo do CPT-11

Stealth®: marca registrada da empresa SEQUUS Pharmaceuticals, Inc., Menlo Park, CA, que corresponde a lipossomas estericamente estabilizados com a superfície contendo PEG.

SUV: lipossomas unilamelares pequenos (Small Unilamellar Vesicles)

SVD: decomposição em valores singulares (Singular Value Decomposition)

T: temperatura

T_m: temperatura de transição de fase

Índice

| | |
|--|------|
| Agradecimento..... | v |
| Curriculum Vitae..... | viii |
| Resumo..... | xiii |
| Abstract..... | xv |
| Abreviações..... | xvi |
| Índice de Figuras..... | xxii |
| | |
| Capítulo I – CPT-11: introdução..... | 1 |
| 1.1. Perspectivas históricas..... | 1 |
| 1.2. Propriedades químicas..... | 3 |
| 1.2.1. Relação estrutura-atividade..... | 3 |
| 1.2.2. Formulações convencionais de fármacos..... | 5 |
| 1.2.3. Formulações alternativas..... | 6 |
| 1.3. Proposta..... | 7 |
| Capítulo II – Objetivos..... | 8 |
| Capítulo III – Parte experimental..... | 9 |
| III.1. Materiais..... | 9 |
| III.2. Estudo fotofísico de CPT-11 na presença de albumina de soro humano (HSA) em tampão fosfato..... | 10 |
| III.3. Preparação e caracterização de lipossomas..... | 10 |
| III.4. Estudo de permeabilidade a prótons em lipossomas..... | 12 |
| III.5. Método quimiométrico..... | 12 |

| | |
|--|-----------|
| Parte I – Interação entre CPT–11 e albumina de soro humano (HSA)..... | 16 |
| Capítulo IV – Estudo da interação entre CPT–11 e albumina de soro humano (HSA).... | 17 |
| IV.1. Estrutura e sítios de interação da proteína albumina de soro humano (HSA)..... | 18 |
| IV.2. Interação de CPT–11 com HSA (30mg/mL): simulação das condições fisiológicas | 20 |
| IV.3. Interação de CPT–11 com HSA em baixa e média concentrações (0,3mg/mL e 3mg/mL)..... | 25 |
| IV.4. Conclusão..... | 26 |
| Parte II – Encapsulamento e caracterização de CPT–11 em lipossomas estericamente estabilizados..... | 27 |
| Capítulo V – Lipossomas: introdução..... | 28 |
| Capítulo VI – Lipossomas: tentativas experimentais..... | 32 |
| VI.1. Estudo fotofísico de CPT–11 encapsulado em lipossomas estericamente estabilizados (CPT–11:LUV)..... | 32 |
| VI.2. Outras tentativas para manter um gradiente transmembrânico de pH..... | 38 |
| Capítulo VII – Migração de prótons através de bicamadas lipídicas..... | 44 |
| VII.1. Introdução..... | 44 |
| VII.2. Modelos de migração de solutos..... | 46 |
| VII.2.1. Modelo de solubilidade–difusão ³ | 46 |
| VII.2.2. Modelo de poros transientes..... | 48 |
| VII.2.3. Modelo de "cluster–contact" ⁴ | 50 |
| VII.3. Discussão..... | 52 |
| VII.3.1. Comparação entre os modelos de migração de solutos em bicamadas lipídicas..... | 52 |
| VII.3.2. Como diminuir e/ou inibir a migração de prótons?..... | 57 |
| Colesterol..... | 57 |
| Experimentos de Haines..... | 58 |
| Sacarose, trealose e PEG..... | 62 |
| Cardiolipina e fosfatidilglicerol em mitocôndrias..... | 65 |
| Lipídios de mielina..... | 65 |
| Considerações finais..... | 68 |
| Capítulo VIII – Lipossomas e gradiente transmembrânico de pH: sucesso experimental | 70 |
| Capítulo IX – Conclusão..... | 77 |

| | |
|--|----|
| Capítulo X – Perspectivas futuras..... | 79 |
| Referências Bibliográficas..... | 80 |
| Apêndice..... | 86 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Estruturas químicas de derivados de Camptotecina (CPT), cujo anel de lactona possui 6 membros, onde R1, R2, R3 e R4 correspondem aos carbonos C7, C9, C10 e C11, respectivamente [Kehrer et al. (2001)]..... | 3 |
| Figura 2 – Relação estrutura–atividade de Camptotecinas, onde 01: substituições aza aumentam a atividade; 02: partes metilenodióxi aumentam a atividade; 03: hidróxi/metóxi aumentam a atividade e substituintes volumosos diminuem a atividade; 04: substituições aumentam a atividade; 05: alquilação aumenta a atividade; 06: certos grupos aumentam a atividade; 07: anel de piridona são essenciais para a atividade; 08: oxigênio necessário; 09: anel de 7 membros estabiliza a lactona; 10: lactona intacta necessária; 11: isômero R inativo; 12: substituições diminuem a atividade [Kehrer et al. (2001)]..... | 5 |
| Figura 3 – Representação esquemática da anisotropia de fluorescência de um fluoróforo [Lentz (1993)]..... | 11 |
| Figura 4 – Bandas espectrais fornecidas pelo método [Lawton and Sylvestre (1971)] para as duas espécies..... | 14 |
| Figura 5 – Curvas puras resolvidas a partir das bandas espectrais da Figura 4..... | 15 |
| Figura 6 – Representação esquemática dos (a) domínios [Petitpas (2001)] e (b) subdomínios [Fleury et al. (1997b)] estruturais de HSA, onde o subdomínio IIA possui o único resíduo de triptofano (Trp ²¹⁴) desta proteína..... | 19 |
| Figura 7 – Espectros de fluorescência de CPT–11, em função do tempo, a 1,00·10 ⁻⁸ mol/L a 37°C, λ_{exc} =370nm, em tampão fosfato (pH 7) por 180min na (a) ausência e na (b) | |

| | |
|--|----|
| presença de HSA (30mg/mL)..... | 21 |
| Figura 8 – (a) Espectros de fluorescência resolvidos e normalizados e (b) intensidade média de fluorescência em função do tempo em tampão fosfato (pH 7) de: (—) forma lactona; (—) forma carboxilato; (—) forma lactona com HSA (30mg/mL); e (—) forma carboxilato com HSA (30mg/mL)..... | 23 |
| Figura 9 – (a) Espectros de fluorescência resolvidos e (b) perfis da intensidade média de fluorescência em função do tempo de tirosina (—) e triptofano (—) presentes no subdomínio IIA da proteína HSA (30mg/mL), em solução contendo CPT-11 em tampão fosfato (pH 7) a 37°C, $\lambda_{exc}=295nm$, por 115min..... | 24 |
| Figura 10 – Representação esquemática de um lipossoma multilamelar (MLV) [Fendler (1982)]..... | 30 |
| Figura 11 – Representação esquemática da interação entre (a) lipossomas convencionais e (b) lipossomas Stealth com lipoproteínas (oval) e anticorpos como a opsonina (formato de Y) [Lasic (1993)]..... | 31 |
| Figura 12 – Espectros de fluorescência, em função do tempo, em tampão HEPES (pH 7,4) a 0,010mol/L com 10% de sacarose (m/v), $\lambda_{exc}=370nm$, de: (a) CPT-11 livre (por 280min, a 37°C) e (b) CPT-11:LUV (por 420min, a 19°C)..... | 34 |
| Figura 13 – Espectros de fluorescência resolvidos e normalizados em tampão HEPES (pH 7,4) a 0,010mol/L com 10% de sacarose (m/v) das formas lactona (—) e carboxilato (—) de CPT-11, e das formas lactona (—) e carboxilato (—) de CPT-11:LUV..... | 35 |
| Figura 14 – Perfis da intensidade média de fluorescência em função do tempo, em tampão HEPES (pH 7,4) a 0,010mol/L com 10% de sacarose (m/v) da (a) forma lactona (—) e da forma carboxilato (—) de CPT-11 e (b) da forma lactona (—) e da forma carboxilato (—) de CPT-11:LUV..... | 36 |
| Figura 15 – Permeabilidade para um soluto pelo modelo de solubilidade-difusão [Paula and Deamer (1999)]..... | 46 |
| Figura 16 – Permeabilidade através de poros transientes hidratados [Paula and Deamer (1999)]..... | 49 |
| Figura 17 – Ilustração de agregados protonados (esquerda) ou desprotonados (direita) de moléculas de água. A ressonância dispersa as cargas, estabilizando o complexo em meio de baixa constante dielétrica [Haines (2001)]..... | 51 |
| Figura 18 – Três modelos para a migração transmembrânica de prótons. Nos dois | |

- primeiros diagramas, o próton move-se de uma monocamada para outra por movimento cinético (kT). No terceiro diagrama, o agregado protonado (positivo) é atraído pelo agregado desprotonado (negativo) através do centro da bicamada [Haines (2001)].....52
- Figura 19 – Dependência da permeabilidade (P) para água, uréia e glicerol com a espessura da bicamada (d). As linhas sólidas representam os valores calculados pelo modelo de solubilidade–difusão e a linha tracejada representa os valores calculados pelo modelo de poros transientes [Paula et al. (1996)].....53
- Figura 20 – Coeficientes de permeabilidade para íons potássio e haletos. As linhas sólidas representam os valores calculados pelo modelo de solubilidade–difusão, as linhas tracejadas representam os valores calculados pelo modelo de poros transientes e os pontos correspondem a dados experimentais [Paula et al. (1996)].54
- Figura 21 – Três modelos possíveis que explicam a hipótese de "cluster–contact". O modelo assume que colisões de agregados na bicamada podem ser inibidas pela presença de hidrocarbonetos no centro da bicamada. Existem três formas de evitar as colisões: (a) inibição de formação de agregados, evitando a entrada de água (esterol, hopanóide ou tetraimanol); (b) ramificações dos terminais das cadeias acila de lipídios (iso–/anteiso–lipídios); e (c) presença de hidrocarbonetos no centro da bicamada (isoprenos: esqualeno, dolicol, ubiquinona) [Haines (2001)].....56
- Figura 22 – Efeito da adição de colesterol na permeabilidade de lipossomas para água (●) e para prótons (▲). Os dados para água foram retirados de Carruthers e Melchior [Carruthers and Melchior (1983)] e para próton de Li et al. [Li et al. (1988)]. Os lipídios são DMPC (água) e PC de ovo (próton). A escala de permeabilidade para prótons é de 10^{-4} [Deamer and Nichols (1989)].....58
- Figura 23 – Substâncias supostas de inibir a migração de prótons em bicamadas: (a) Iso–/anteiso–lipídios presentes em ambos organismos acidófilos e alcalífilos; (b) Esqualeno presente em alcalífilos; (c) Hopanóides presentes em acidófilos; (d) Fosfolipídios encontrados em bactérias [Haines (2001)].....59
- Figura 24 – (a) Estrutura de colesterol encontrada em membranas que possuem gradiente de Na^+ . (b) Alguns fitosteróis típicos presentes em membranas de organismos eucariontes que possuem gradiente de prótons. (c) Conformações da cadeia lateral de colesterol observadas em estruturas cristalinas. Os números entre parênteses indicam o número de cristais para cada confôrmero. As setas representam conformações Gauche [Haines (2001)].....61

| | |
|--|----|
| Figura 25 – Estruturas de alguns isoprenos: (a) ubiquinona; (b) plastoquinona; e (c) dolicol [Haines (2001)]..... | 62 |
| Figura 26 – Molécula de fosfatidilcolina e a orientação dos grupos carbonila <i>sn-1</i> e <i>sn-2</i> . A ligação de hidrogênio da carbonila <i>sn-2</i> com açúcar ou água está indicada [Díaz et al. (1999)]..... | 63 |
| Figura 27 – Fluxo de prótons em bicamadas lipídicas de lipossomas preparados a partir de lipídios de mielina, usando a sonda fluorescente 9AA ($Q=I/I_0$; Time=tempo) [Díaz and Monreal (1994)]..... | 66 |
| Figura 28 – Monitoramento da permeabilidade a prótons de lipossomas LUV preparados com lipídios de mielina em diferentes ΔpH , a partir da sonda fluorescente 9AA ($Q=I/I_0$; Time=tempo) [Díaz and Monreal (1994)]..... | 67 |
| Figura 29 – (a) Espectros de emissão de fluorescência resolvidos e (b) perfis da intensidade média de fluorescência em função do tempo das formas lactona (—) e carboxilato (– –) de CPT-11:LUV (experimento 05 do Esquema 3), em tampão HEPES (pH 7,4) a 0,010mol/L com trealose 30mM, a 37°C..... | 73 |
| Figura 30 – Monitoramento da permeabilidade a prótons de lipossomas LUV, preparados com DSPC, DSPE-PEG, DSPG, colesterol em tampão lactato contendo sacarose 10% (m/v), em diferentes ΔpH , a partir da sonda fluorescente 9AA, de acordo com o experimento citado em [Díaz and Monreal (1994)], a 37°C, por 550s, $\lambda_{exc}=400nm$ e $\lambda_{em}=455nm$. O pH das soluções foram 4,12 ($\Delta pH=0$), 6,50 ($\Delta pH=2,38$) e 7,38 ($\Delta pH=3,26$)..... | 75 |
| Figura 31 – Monitoramento da permeabilidade a prótons de lipossomas LUV, preparados com DSPC, DSPE-PEG, DSPG, colesterol em tampão lactato contendo trealose 30mM, em diferentes ΔpH , a partir da sonda fluorescente 9AA, de acordo com o experimento citado em [Díaz and Monreal (1994)], a 37°C, por 530s, $\lambda_{exc}=400nm$ e $\lambda_{em}=455nm$. O pH das soluções foram 4,16 ($\Delta pH=0$), 6,43 ($\Delta pH=2,27$) e 7,34 ($\Delta pH=3,18$)..... | 75 |

Capítulo I

CPT-11: introdução

I.1. Perspectivas históricas

Em 1958, os extratos da árvore asiática camptoteca foram usados no Instituto Nacional do Câncer (NCI), nos Estados Unidos, sendo as atividades antitumorais estabelecidas nos modelos experimentais. A Camptotecina (CPT), um alcalóide isolado desta planta, foi descoberta durante a década de 1950, enquanto milhares de plantas eram analisadas na busca de uma fonte de esteróides, que poderia ser usada na síntese de cortisona [O'Leary and Muggia (1998)].

Durante esta pesquisa, Monroe Wall e Mahsukh Wahi descobriram a Camptotecina e seus análogos naturais. Encontrada na madeira, na casca e no fruto da árvore *Camptotheca acuminata*, a Camptotecina é usada há séculos na medicina tradicional chinesa no tratamento de várias doenças, incluindo tumores [O'Leary and Muggia (1998)].

Horwitz, Kessel e outros pesquisadores estudaram as ações bioquímicas de CPT e mostraram que CPTs inibem as sínteses de DNA e RNA. Quando o fármaco foi removido, a inibição da síntese de RNA foi totalmente revertida, enquanto que a síntese de DNA foi somente parcialmente recuperada. Subseqüentemente, Wall e Horwitz demonstraram que a forma lactona do fármaco era responsável pela sua atividade e que existia um equilíbrio, dependente de pH, entre as formas lactona e carboxilato [O'Leary

and Muggia (1998)].

Como a Camptotecina tem solubilidade limitada em água, um sal de sódio foi formulado para o uso em testes clínicos. No final dos anos de 1960, Gottlieb e Muggia iniciaram os testes clínicos de fase I no NCI. Os resultados destes testes e resultados parciais dos estudos de fase II foram publicados no início da década de 1970. Devido aos severos efeitos colaterais descobertos no início dos estudos clínicos, como mielossupressão, diarreia crônica, neutropenia, trombocitopenia e cistite hemorrágica, estes trabalhos foram interrompidos [O'Leary and Muggia (1998)].

No início da década de 1980, importantes descobertas resultaram no reinteresse por este composto: (i) a enzima topoisomerase I foi identificada como o alvo celular de Camptotecina e seus derivados. A topoisomerase I é uma enzima envolvida na abertura transiente da dupla hélice de DNA e na sua religação durante as fases de replicação e transcrição. A formação de um complexo ternário CPT–topoisomerase I–DNA, reversível, e a interferência com a etapa de reparamento de bases foram reconhecidas como o mecanismo primário da ação de CPT, proporcionando a quebra de dupla hélice de DNA e, conseqüentemente, a morte celular. Investigações posteriores indicaram uma super-expressão desta enzima em vários tipos de tumores sólidos, como câncer de ovário e de cólo, mas não em tecidos normais [O'Leary and Muggia (1998)], [Kehrer et al. (2001)]; (ii) simultaneamente, foi mostrado que os problemas encontrados nos estudos clínicos de CPT estavam relacionados à baixa solubilidade do composto em água, que necessitava de condições alcalinas para a administração intravenosa. Tais condições drásticas proporcionavam tanto a modificação química da estrutura original em um composto inativo terapeuticamente (forma carboxilato), quanto a indução de alterações no comportamento toxicológico do composto.

Estas duas descobertas impulsionaram as pesquisas sobre a identificação e desenvolvimento de novos derivados semi-sintéticos com maior solubilidade em água, mas com o mesmo mecanismo de ação (Figura 1). Alguns destes compostos ainda estão em desenvolvimento clínico, enquanto que o Irinotecan (CPT–11) e o Topotecan já estão comercialmente disponíveis, sendo usados no tratamento de câncer colorretal, e de ovário e pulmão, respectivamente.

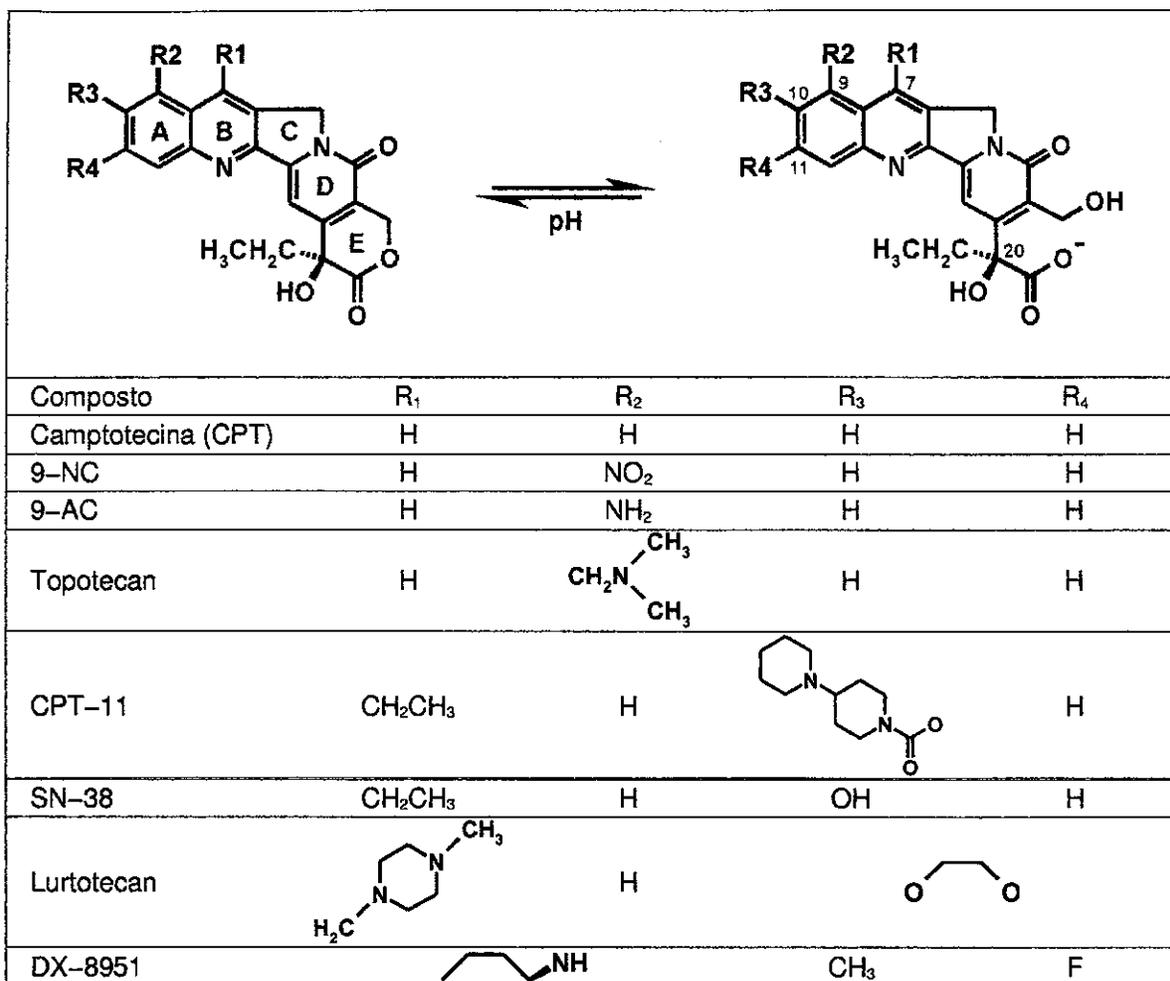


Figura 1 – Estruturas químicas de derivados de Camptotecina (CPT), cujo anel de lactona possui 6 membros, onde R₁, R₂, R₃ e R₄ correspondem aos carbonos C7, C9, C10 e C11, respectivamente [Kehrer et al. (2001)].

I.2. Propriedades químicas

I.2.1. Relação estrutura–atividade

A maioria dos derivados de CPT possui basicamente uma estrutura pentacíclica, constituída por um anel de quinolina (anéis A e B), um anel piridona (anel D) e um anel terminal α -hidroxi- δ -lactona (anel E), que possui um centro quiral no carbono C20, como pode ser visto na Figura 1. Os estudos sobre a síntese de novos derivados de CPT e de relação estrutura–atividade produziram conhecimento para a criação de compostos mais eficientes (Figura 2). Estudos de estrutura–atividade indicaram, também, a

correlação entre a habilidade de inibir a topoisomerase I e o potencial citotóxico. Algumas partes da estrutura de CPT são particularmente interessantes [Kehrer et al. (2001)]:

- (i) a atividade inibitória à topoisomerase I destes compostos é estereoespecífica, sendo o isômero (S) de CPT muito mais potente que o isômero (R);
- (ii) geralmente, as substituições nos carbonos C7, C9 e C10 tendem a aumentar a ação inibitória à topoisomerase I, por vezes aumentando a sua solubilidade à água. Em contrapartida, substituições no carbono C12 diminuem a atividade antineoplásica;
- (iii) analogamente, a formação de anéis na estrutura, por exemplo entre os carbonos C7 e C9 ou C10 e C11, pode aumentar a atividade;
- (iv) uma das propriedades químicas desta classe de compostos é a presença do anel de lactona (anel E), que é essencial para a atividade antitumoral, bem como proporciona um grau de instabilidade a estes compostos em solução aquosa. Todas as Camptotecinas podem sofrer uma interconversão reversível, dependente do pH, entre o anel da forma lactona e a forma carboxilato hidrolizada (Figura 1), onde somente a forma lactona é capaz de difundir através das membranas celulares e exercer atividade inibitória à topoisomerase I. Em condições neutras ou fisiológicas, o equilíbrio entre estas duas espécies favorece a forma carboxilato para todos os tipos de CPTs. A compreensão de como a reação de hidrólise ocorre pode ajudar a explicar muitas observações encontradas no desenvolvimento destes compostos. Como CPT era administrado na forma de sal sódico, os pacientes eram expostos a altas concentrações da espécie carboxilato inativa, sendo grandes quantidades do fármaco excretadas pela urina, onde o baixo pH favorece o fechamento do anel de lactona, que conseqüentemente causa cistite hemorrágica. O equilíbrio entre as espécies lactona e carboxilato depende não somente do pH, mas, também, da presença de proteínas de ligação específica em matrizes biológicas, mais notadamente a albumina de soro humano (Human Serum Albumin, HSA). Burke e colaboradores [Burke et al. (1995)] observaram que, após o estabelecimento do equilíbrio a 37°C em tampão fosfato salino (PBS), quantidades semelhantes da forma lactona de vários derivados de CPT foram encontradas, com valores de 17, 19, 15, 13 e 15% para CPT, 9-AC, Topotecan, CPT-11 e SN-38, respectivamente. Eles observaram que a adição de 40mg/mL de HSA deslocou o equilíbrio de CPT e 9-AC para a formação de carboxilato, com aproximadamente 1% de forma lactona presente no equilíbrio. Em contrapartida, HSA estabiliza a forma lactona de CPT-11 e SN-38, com valores a 30

e 39%, respectivamente. Estes autores propuseram que as diferenças nas porcentagens da forma lactona presentes no equilíbrio estavam relacionadas a efeitos estéricos dos vários substituintes nas posições R₁ e R₂ (Figura 1), onde causam impedimento estérico, evitando a ligação da espécie carboxilato à HSA, favorecendo a forma lactona no equilíbrio [Burke et al. (1995)].

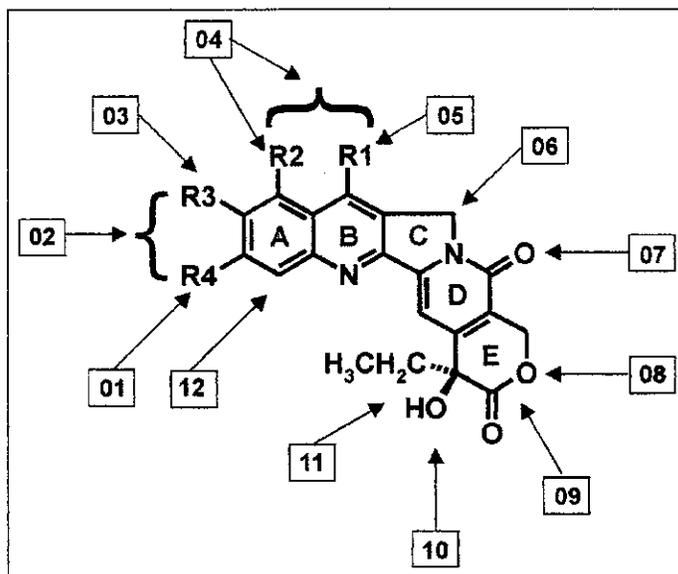


Figura 2 – Relação estrutura–atividade de Camptotecinas, onde **01**: substituições aza aumentam a atividade; **02**: partes metilenodióxi aumentam a atividade; **03**: hidróxi/metóxi aumentam a atividade e substituintes volumosos diminuem a atividade; **04**: substituições aumentam a atividade; **05**: alquilação aumenta a atividade; **06**: certos grupos aumentam a atividade; **07**: anel de piridona são essenciais para a atividade; **08**: oxigênio necessário; **09**: anel de 7 membros estabiliza a lactona; **10**: lactona intacta necessária; **11**: isômero R inativo; **12**: substituições diminuem a atividade [Kehrer et al. (2001)].

1.2.2. Formulações convencionais de fármacos

A instabilidade da forma lactona e a inatividade terapêutica da forma carboxilato estimularam o desenvolvimento de uma dosagem adequada de CPTs aos pacientes. Como a forma lactona é favorecida em meio ácido, os compostos Topotecan e CPT-11 são comercializados em meio tamponado. Topotecan é comercializado em pó, contendo o cloridrato de Topotecan com ácido tartárico, produzindo uma solução aquosa com pH 2,5–3,5 quando resuspendido para infusão via intravenosa. Tal solução é estável por 12h à temperatura ambiente, enquanto o pó tem validade de 2 anos em temperatura

ambiente.

O nome comercial de CPT-11 é Camptosar (Pharmacia & Upjohn), sendo a sua formulação baseada também na forma de cloridrato em solução aquosa, contendo tampão ácido láctico-hidróxido de sódio, com pH 3,5-4,5. Esta solução é estável por 3h à temperatura ambiente, ao abrigo da luz.

1.2.3. Formulações alternativas

Nos últimos anos, várias formulações alternativas de CPTs foram e estão sendo desenvolvidas com o propósito de disponibilizar doses similares às formulações convencionais, com a vantagem de serem mais estáveis clinicamente (forma lactona). Apesar das intensas tentativas, somente poucas formulações conseguiram satisfazer estes requisitos. Estas reformulações de CPT e seus derivados pretendem estabilizar a forma lactona ou induzir sua liberação controlada combinada à seletividade a tumores. Um exemplo é a encapsulação de CPT, CPT-11 ou 10-hidróxi-CPT em microesferas constituídas de ácido poli-láctico ou ácido poli-láctico-glicólico [Machida et al. (2000)], [Shenderova et al. (1999)], [Shenderova et al. (1997)]. Tais microesferas foram capazes de estabilizar a espécie lactona, devido ao ambiente ácido deste veículo, bem como aumentar as características farmacocinéticas em modelos animais. Como estes sistemas ainda não foram testados com estudos de fase I, do ponto de vista teórico, o uso de CPTs em microesferas poderia reduzir a toxicidade local e aumentar a eficiência terapêutica [O'Leary and Muggia (1998)].

Outra formulação alternativa envolve a encapsulação de CPT e derivados em lipossomas, constituídos por fosfolipídios naturais ou sintéticos. Apesar de existirem alguns trabalhos envolvendo a encapsulação de Topotecan [Burke and Gao (1994)] e CPT-11 [Sadzuka et al. (1997)], [Sadzuka et al. (1999)] em diferentes sistemas lipossomais, pouca informação existe sobre o perfil de toxicidade e a atividade antineoplásica destes sistemas. No entanto, formulações de lipossomas unilamelares contendo lurtotecan (SPI-355) [Colbern et al. (1998)] apresentaram uma melhora terapêutica significativa em relação à do fármaco livre, sendo a elevada atividade consistente com o aumento da exposição sistêmica e da seletividade/especificidade do fármaco a tumores, embora também tenha aumentado a toxicidade.

A incorporação de CPT e derivados em nanopartículas, como por exemplo compostas por ácido esteárico, lecitina de soja e copolímero polioxietileno-polipropileno (Polaxamer 188) [Yang et al. (1999)], e em macromoléculas como dimetil- β -ciclodextrina

[Underberg et al. (1990)], proporcionou a estabilização do anel de lactona. Embora tais sistemas tenham-se mostrado eficazes na liberação controlada e na especificidade em modelos pré-clínicos, testes clínicos ainda não foram realizados e, portanto, não se conhece sua verdadeira eficácia.

I.3. Proposta

Como vimos, a atividade antineoplásica de Camptotecina e seus derivados baseia-se na formação do complexo ternário reversível entre a enzima topoisomerase I (topo), o fármaco e o DNA. Alguns estudos demonstraram a possibilidade da interação CPT-topo-DNA ocorrer através dos anéis A e E [Nabiev et al. (1998)]. A configuração do centro quiral C-20 também é importante. Verificou-se que 20(R)-camptotecina, que não existe na natureza, foi inativa terapeuticamente em testes *in vitro* e *in vivo* [Dey and Warner (1996)]. Além disso, a forma carboxilato possui cargas, exibindo difusão limitada através de bicamadas lipídicas de membranas celulares [Nabiev et al. (1998)]. Portanto, a existência do anel de lactona é fundamental para o efeito antineoplásico e a sua hidrólise contribui para a diminuição da eficácia terapêutica [Dey and Warner (1997)]. Além da hidrólise, outro fator que afeta a disponibilidade da forma lactona de CPT-11 é a sua interação com a albumina do plasma sanguíneo (30mg/mL) [Mi and Burke (1994a)], [Fleury et al. (1997a)].

A hidrólise da forma lactona e sua interação com a albumina, aliada aos efeitos colaterais causados pelo fármaco, motivaram a encapsulação de CPT-11 em lipossomas estericamente estabilizados, de forma a diminuir sua hidrólise, melhorar sua eficácia terapêutica, sua farmacocinética e reduzir seus efeitos colaterais. A encapsulação e a caracterização deste sistema lipossomal são descritas na Parte II deste trabalho. Antes de iniciarmos o estudo de encapsulação de CPT-11 em lipossomas, era fundamental estabelecer o princípio de hidrólise do fármaco e avaliar a perturbação que a albumina causa neste equilíbrio. Assim, realizamos um estudo sobre a interação entre CPT-11 e albumina, descrito na Parte I deste trabalho.

Capítulo II

Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram: (1) estabelecer o princípio de hidrólise do fármaco CPT-11 e avaliar se existe a estabilização da forma lactona de CPT-11 na presença de HSA e se ocorrem mudanças na estrutura secundária desta proteína; e (2) encapsular e caracterizar os lipossomas estericamente estabilizados contendo CPT-11, em um sistema que mantenha um gradiente transmembrânico de pH, a fim de estabilizar a forma lactona intacta por um grande intervalo de tempo.

Capítulo III

Parte experimental

III.1. Materiais

Neste trabalho, foram usados os seguintes reagentes:

- CPT-11 (Pharmacia & Upjohn, com 99% de pureza);
- HSA, albumina de soro humano (Fração V, Sigma);
- Colesterol (Genzyme, 99% de pureza);
- Os fosfolípidios:
 - 1,2-diestearoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (diestearoilfosfatidilcolina ou DSPC, Sigma e Genzyme, ambos com 99% de pureza);
 - N-(carbonil-metoxipolietilenoglicol 2000)-1,2-diestearoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina sódica (DSPE-PEG 2000, Avanti e Genzyme, ambos com 99% de pureza);
 - 1,2-diestearoil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol sódico (diestearoilfosfatidilglicerol ou DSPG, Genzyme, 99% de pureza);
- 9-aminoacridina (recristalizada);
- Ácido láctico (Vetec, com 99% de pureza);
- Lactato de sódio (Vetec, com 99% de pureza);
- Fosfato monobásico de sódio (Ecibra, com 99% de pureza);
- Fosfato dibásico de sódio (Ecibra, com 99% de pureza);

- Ácido cítrico (Ecibra, com 99% de pureza);
- Citrato de sódio (Ecibra, com 99% de pureza);
- HEPES (Sigma, com 99% de pureza);
- Sacarose (Sigma, 99% de pureza);
- Trealose (Sigma, com 99% de pureza);
- Sephadex G-10 e G-25 (Pharmacia);
- Solventes clorofórmio e metanol (ambos com grau de pureza p.a., Merck);
- água deionizada (deionizador Millipore, marca Milli Q-plus).

III.2. Estudo fotofísico de CPT-11 na presença de albumina de soro humano (HSA) em tampão fosfato

Os espectros de fluorescência de soluções de CPT-11 e de HSA em tampão lactato (pH 4) e fosfato (pH 7), ambos a 0,010mol/L, foram obtidos no espectrofluorímetro SLM-AMINCO (SPF-500C), com lâmpada de xenônio (250W) como fonte de excitação. Os comprimentos de onda de excitação foram 295nm, monitorando a excitação do resíduo de triptofano de HSA, e 370nm, monitorando a excitação de CPT-11.

III.3. Preparação e caracterização de lipossomas

Os lipossomas CPT-11-Stealth (CPT-11:LUV) foram preparados de acordo com a técnica de hidratação do filme lipídico seco [Lasic (1993)], [New (1989)]. Os lipídios DSPC, DSPE-PEG 2000, DSPG, colesterol e o CPT-11 foram dissolvidos na mistura clorofórmio:metanol a 2:1 (v/v). Estes solventes foram evaporados à pressão reduzida, a 35°C. O filme lipídico seco foi hidratado com 10mL de tampão lactato (pH 4) a 0,010mol/L com 10% de sacarose (m/v) a 70°C, obtendo-se lipossomas multilamelares (MLV). Para preparar vesículas unilamelares (LUV), as soluções lipossomais foram submetidas a 10 ciclos de extrusão (com a extrusora Avestin, modelo LiposoFast™-100), em membranas de policarbonato (Poretics) com poros de diâmetro igual a 100nm. Em seguida, foi feita a separação entre o composto livre e encapsulado em lipossomas LUV, a partir técnica de ultrafiltração, utilizando cela (fabricação própria) e membrana para ultrafiltração YM30 (Millipore), ou através do método de centrifugação de mini-colunas de cromatografia por exclusão em gel (Sephadex G-10 e G-25) [New (1989)], [Burke and Gao (1994)].

A distribuição de tamanhos dos lipossomas foi conseguida através de espalhamento dinâmico quase elástico de luz (QELS), em um equipamento marca Brookhaven Instruments Corp., modelo BI-MAS, que utiliza a espectroscopia de correlação de fótons.

Os espectros de absorção na região de UV/VIS foram registrados em um espectrofotômetro com detector de arranjo de diodos, marca Hewlett-Packard, modelo 8452.

Os espectros de fluorescência de soluções de CPT-11 livre e encapsulado em lipossomas, em tampão lactato (pH 4) e HEPES (pH 7,4), ambos a 0,010mol/L, em 10% de sacarose (m/v) ou trealose a 30mM, foram obtidos no espectrofluorímetro SLM-AMINCO (SPF-500C), com lâmpada de xenônio (250W) como fonte de excitação, usando o comprimento de onda de excitação de 370nm.

As medidas de anisotropia de fluorescência no estado estacionário foram feitas no fluorímetro Fluorolog 3 da Jobin Yvon-Spex, equipado com polarizadores Glan-Thompson, em configuração L, com fendas de excitação e emissão de 2nm, no laboratório do Prof. Amando S. Ito, no IF/USP-SP.

Estas medidas são realizadas com luz polarizada, que somente excita as moléculas, cujo o momento dipolo está alinhado com o vetor elétrico. No estado excitado, existe a alteração da configuração da molécula, provocando uma mudança no momento dipolo. Assim, a emissão da fluorescência do fluoróforo (após um intervalo τ) possui um momento dipolo desalinhado com o vetor elétrico, como mostra a Figura 3.

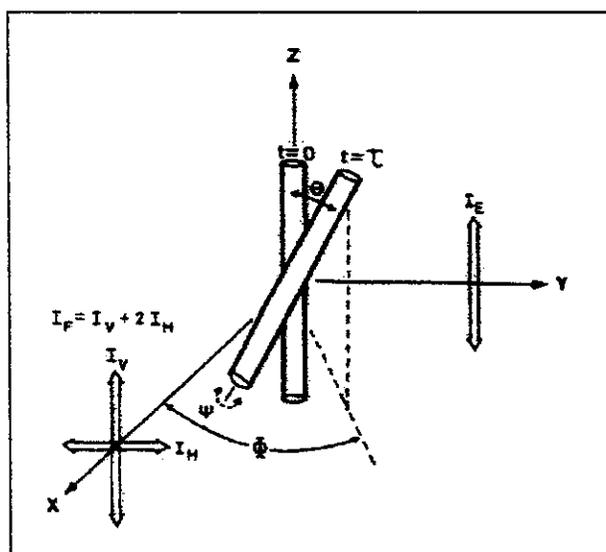


Figura 3 – Representação esquemática da anisotropia de fluorescência de um fluoróforo [Lentz (1993)].

O resultado da polarização da fluorescência é geralmente definido em termos de grau de anisotropia de fluorescência no estado estacionário (r):

$$r = \frac{(I_V - I_H)}{(I_V + 2I_H)}, \quad (1)$$

onde I_V e I_H são, respectivamente, as intensidades medidas nas direções paralela (vertical) e perpendicular (horizontal) em relação ao vetor elétrico da fonte de excitação. A intensidade total de fluorescência (I_F) é dada por:

$$I_F = I_V + 2I_H \quad (2)$$

III.4. Estudo de permeabilidade a prótons em lipossomas

Uma alíquota de lipossomas LUVs preparados em tampão lactato (pH 4) a 0,010mol/L com 10% de sacarose (m/v) ou trealose a 30mM, foi adicionada a uma cubeta de quartzo que continha 2mL de tampão citrato ou HEPES, ambos a 0,010mol/L, com valores de pH variando de 4 a 7, e 6 μ M de 9-aminoacridina recristalizada. As medidas de fluorescência foram realizadas a 37°C, com excitação em 400nm, monitorando a fluorescência em 455nm, por 550s.

III.5. Método quimiométrico

Nesta seção, descreve-se brevemente o método quimiométrico, conhecido como *Self Modeling Curve Resolution*, utilizado no tratamento dos dados desta tese. Para uma descrição detalhada do método, consulte o artigo de Lawton e Sylvestre [Lawton and Sylvestre (1971)].

Suponha que duas curvas contínuas conhecidas são usadas, por meio de combinações lineares, para construir um conjunto de curvas, ou seja, cada curva do conjunto é a soma das duas curvas básicas (*puras*) com diferentes pesos. Esta estrutura presta-se à modelagem de várias situações de interesse real. Um caso típico é um conjunto de espectros de emissão de fluorescência de soluções compostas por duas substâncias. Cada curva do conjunto de dados (um espectro de emissão lido) é a soma de duas curvas (os espectros de emissão das duas substâncias puras que compõem a

solução), e pondera por pesos que, em última análise, estão relacionadas com as concentrações das substâncias. O *problema* inverso a ser considerado é, partindo do conjunto de curvas, recuperar as duas curvas puras e as proporções nas quais foram combinadas. O método introduzido por Lawton e Sylvestre [Lawton and Sylvestre (1971)] presta-se justamente a este propósito. Nesse sentido, o método proposto mostra-se adequado para o tratamento de dados de fluorescência de misturas com duas substâncias. Vale ressaltar que o este método considera apenas a situação onde o conjunto de dados é gerado por combinações lineares de duas curvas puras. Para métodos que tratam de dados onde há mais que duas espécies envolvidas, consulte por exemplo [Massart et al. (1998)].

Seguindo a notação de descrita em [Lawton and Sylvestre (1971)], denotaremos a i -ésima curva medida experimentalmente por $Y_i(\lambda)$, onde $i=1, \dots, m$, m é o número total de curvas lidas e λ é o comprimento de onda. Por $f_1(\lambda)$ e $f_2(\lambda)$ denotaremos as curvas das substâncias puras. A hipótese fundamental que o método faz é que:

$$Y_i(\lambda) = c_{1i} f_1(\lambda) + c_{2i} f_2(\lambda) \quad (3)$$

Note, no entanto, que há leituras apenas para um conjunto discreto de comprimentos de onda. Desta forma, o mais adequado é denotarmos por Y_{ij} o valor da i -ésima curva para o j -ésimo comprimento de onda λ_j , onde $j=1, \dots, n$ e n é o número de diferentes comprimentos para os quais foram feitas medidas. Com isso, a equação (3), é reescrita como:

$$Y_{ij} = Y_i(\lambda_j) = c_{1i} f_1(\lambda_j) + c_{2i} f_2(\lambda_j) = c_{1i} f_{1j} + c_{2i} f_{2j} \quad (4)$$

Em outras palavras, cada linha da matriz $Y = [Y_{ij}]$, onde Y_{ij} é o valor medido no experimento i , para o comprimento de onda j , é uma combinação linear dos dois vetores, f_1 e f_2 . Deve-se notar que a separação das curvas medidas em curvas puras só é possível de ser alcançada caso as curvas puras não sejam múltiplas entre si, ou seja, caso os vetores f_1 e f_2 sejam linearmente independentes. Do contrário, seria como ter uma "mistura" formada por "duas" substâncias "iguais".

Como a curva de uma substância pura não sofre alteração em sua forma quando há variação na concentração, mas apenas na amplitude, para eliminar possíveis ambigüidades, o método obtém as curvas puras normalizadas segundo algum critério. O critério ideal seria obter as curvas para uma dada concentração fixa. No entanto, nem sempre é possível relacionar diretamente as intensidades de emissão de fluorescência a concentrações. Em [Lawton and Sylvestre (1971)], essa normalização é tal que as

curvas possuem área unitária. Em nosso caso, adotou-se um critério diferente de normalização que admitisse uma interpretação mais simples. Convencionou-se adotar o critério de amplitude média unitária. Ou seja, no caso de curvas de intensidade de emissão de fluorescência, as curvas puras obtidas têm a propriedade de ter intensidade de emissão média unitária, isto é, se $\Delta\lambda = (\lambda_{m\acute{a}x} - \lambda_{m\acute{i}n})$, então

$$\frac{1}{\Delta\lambda} \int_{\lambda_{m\acute{i}n}}^{\lambda_{m\acute{a}x}} f_i(\lambda) d\lambda = 1 . \quad (5)$$

A ferramenta matemática utilizada para atacar esta questão é a Decomposição em Valores Singulares ou SVD (Singular Value Decomposition) (veja, por exemplo, [Trefethen and Bau III (1997)]). Através do cálculo da SVD de uma matriz, é possível encontrar os vetores (em nosso caso, apenas dois), capazes de gerar a matriz dos dados por meio de combinações lineares, tal qual as curvas puras. No entanto, não há porque esse vetores serem diretamente aqueles que representam as curvas das substâncias puras. O que se pode afirmar é que a dupla de vetores fornecida pela SVD é capaz de gerar a dupla de vetores associada às curvas puras. Desta forma, há ainda que se descobrir qual a combinação linear da dupla geradora obtida que pode fornecer o par de vetores procurado. Infelizmente, sem hipóteses adicionais, não é possível descobrir tais combinações lineares. O máximo que se pode obter são faixas, ou bandas espectrais, que confinam os espectros puros, como na Figura 4.

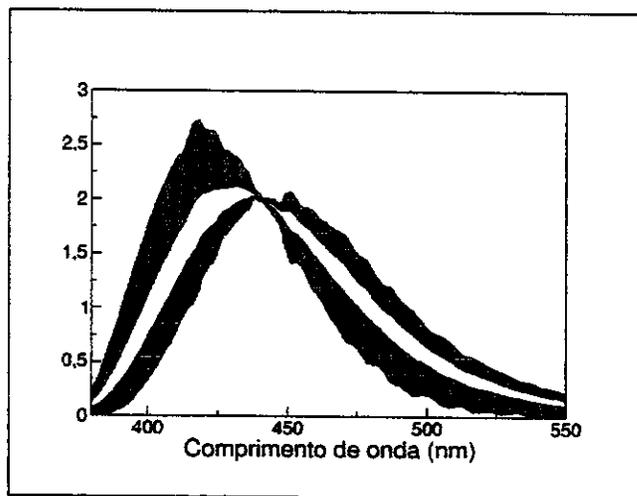


Figura 4 – Bandas espectrais fornecidas pelo método [Lawton and Sylvestre (1971)] para as duas espécies.

Se for razoável supor que existam dois comprimentos de onda λ_1 e λ_2 , dentro do

intervalo usado nos experimentos, para os quais

$$\begin{aligned} f_1(\lambda_1) &= 0, f_2(\lambda_1) > 0 \\ f_1(\lambda_2) &> 0, f_2(\lambda_2) = 0 \end{aligned} \quad (6)$$

então a partir dos vetores obtidos pela SVD, torna-se possível obter a combinação linear que finalmente fornece os vetores que representam discretamente as curvas das substâncias puras, segundo a normalização adotada. Por exemplo, a Figura 5 mostra quais seriam as curvas puras, a partir da banda espectral da Figura 4 e supondo a condição (6).

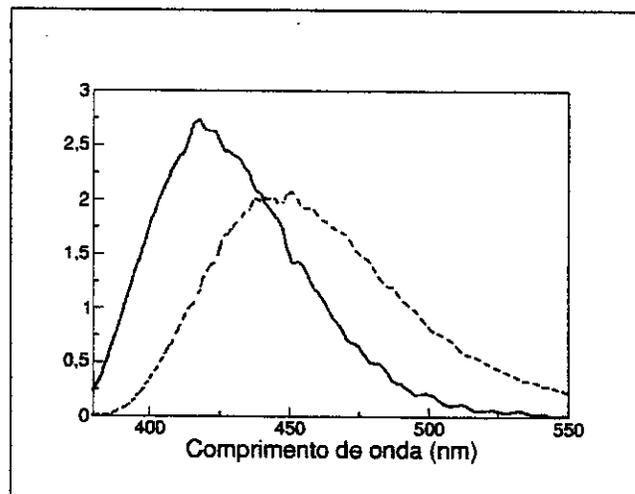
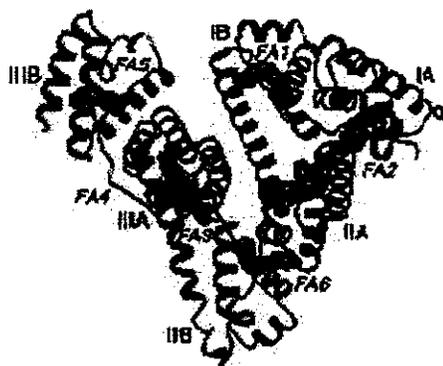


Figura 5 – Curvas puras resolvidas a partir das bandas espectrais da Figura 4.

Para a aplicação do método comentado, uma rotina computacional foi implementada, cujo o código fonte é apresentado no **Apêndice**.

Parte I

Interação entre CPT-11 e albumina de soro humano (HSA)



Capítulo IV

Estudo da interação entre CPT-11 e albumina de soro humano (HSA)

A Camptotecina e seus derivados, como o CPT-11, possuem um anel α -hidroxi- δ -lactona, responsável pela atividade antitumoral. Este anel hidroliza sob condições fisiológicas (pH 7,4), resultando na forma carboxilato, terapeuticamente inativa [Dey and Warner (1997)], [Mi and Burke (1994a)], [Sadzuka et al. (1997)]. Este equilíbrio é alterado quando o composto é injetado na corrente sangüínea. A albumina presente no plasma (30mg/mL) interage com a forma lactona de CPT-11, contribuindo provavelmente para uma menor ação terapêutica do fármaco [Mi and Burke (1994a)], [Mi et al. (1995)], [Fleury et al. (1997)]. Segundo Mi e Burke, esta interação com HSA resulta na estabilidade da forma lactona no plasma [Mi and Burke (1994a)].

Antes de iniciarmos o estudo de encapsulação de CPT-11 em lipossomas, era fundamental estabelecer o princípio de hidrólise do fármaco e avaliar a perturbação que a albumina causa neste equilíbrio. Este trabalho foi realizado no segundo ano do doutorado e apresentado no VI Encontro Latino-americano de Fotoquímica e Fotofísica (ELAFOT VI), realizado entre 12 a 16 de setembro de 1999, em Teresópolis, Rio de Janeiro ("Photophysical Study of CPT-11 in Human Serum Albumin (HSA) Solution with a Chemometric Approach"). Repetimos estes experimentos, utilizando diferentes concentrações de HSA, que enriqueceram o trabalho.

Assim, esta parte do trabalho pretendeu avaliar se existia a estabilização da forma

lactona de CPT-11 na presença de HSA e se ocorreriam mudanças na estrutura secundária da proteína, devido à interação com CPT-11, a partir da cinética de hidrólise de CPT-11, monitorada pelos espectros de emissão de fluorescência, em diferentes concentrações de HSA.

IV.1. Estrutura e sítios de interação da proteína albumina de soro humano (HSA)

A albumina de soro humano é a proteína presente em maior concentração no plasma sanguíneo, mas também está presente nos fluidos intersticiais dos tecidos corpóreos. Esta proteína liga-se a um grande número de compostos endógenos relativamente insolúveis, tais como ácidos graxos não-esterificados, bilirrubina e ácidos biliares, facilitando, portanto, o transporte destes compostos através da circulação [Petitpas (2001)]. HSA é também capaz de ligar-se a uma vasta variedade de fármacos, sendo estes complexos de grande interesse para o direcionamento de medicamentos ("drug delivery"). A complexação de fármacos a proteínas do plasma, tais como HSA, pode ser um fator importante na farmacocinética do fármaco, restringindo a concentração de fármaco livre e afetando sua distribuição e eliminação. Em alguns casos, a maior fração de fármaco administrado é seqüestrada por HSA, como por exemplo a varfarina (anticoagulante), onde 99% de sua concentração interage com a proteína, sob condições terapêuticamente normais e, conseqüentemente, possui um pequeno volume de distribuição e baixa liberação [Petitpas (2001)].

HSA tem um número limitado de sítios de interação para ligantes endógenos e exógenos, de forma que a interação do fármaco com a proteína pode ser afetada por vários fatores. Mas, para entender tal interação e avaliar suas propriedades como proteína de transporte no direcionamento de fármacos, é necessário obter informações estruturais sobre HSA [Petitpas (2001)].

HSA, proteína com 585 resíduos de aminoácidos, é monomérica, mas contém três domínios de α -hélice estruturalmente homólogos (I, II e III), como mostra a Figura 6(a). Cada domínio pode ser dividido em subdomínios A e B, que possuem 6 e 4 α -hélices, respectivamente, como indicado na Figura 6(b) [Fleury et al. (1997b)], [Petitpas (2001)]. O subdomínio A possui duas pequenas α -hélices unidas por um par de pontes de dissulfeto, formando um pequeno *loop* duplo.

Estudos estruturais [Petitpas (2001)] mapearam a localização de sítios de ligação de

ácidos graxos e sítios primários de ligação de fármacos em HSA. Os sítios de ligação de ácidos graxos estão distribuídos ao longo da proteína e envolvem todos os seis subdomínios. Por outro lado, muitos fármacos ligam-se a um dos dois sítios primários de ligação na proteína, conhecidos como sítios de Sudlow I e II. Embora existam vários exemplos de ligação de fármaco em vários sítios da proteína, a maioria dos trabalhos é baseada nos sítios primários de ligação de fármacos [Petitpas (2001)].

Estudos cristalográficos demonstraram que os sítios I e II de interação de HSA com fármacos estão localizados respectivamente nos subdomínios IIA e IIIA [Fleury et al. (1997b)], [Petitpas (2001)]. No subdomínio IIIA está a cavidade de ligação mais ativa de HSA, que acomoda melhor os fármacos, como por exemplo AZT (azido-3'-deoxitimidina), digitoxina e ibuprofeno. Substâncias como a varfarina, fenilbutazona, tolbutamida e indometacina interagem com o sítio IIA.

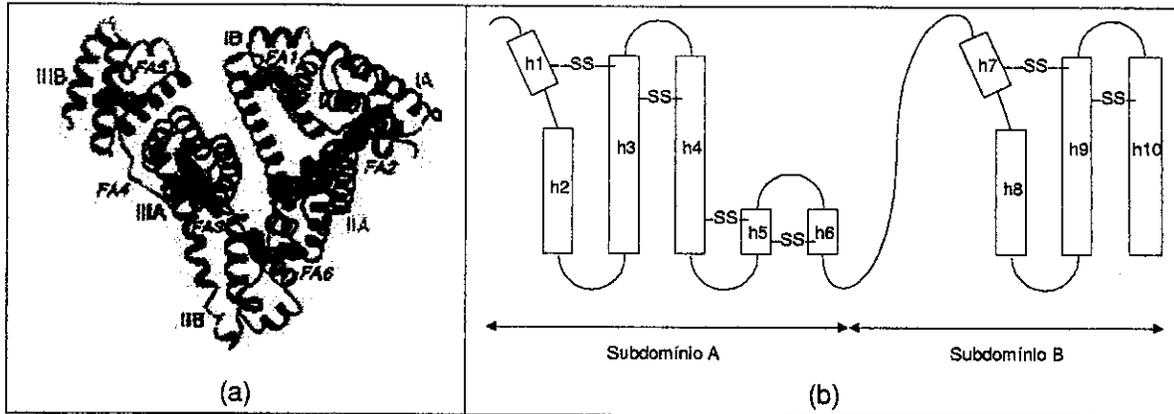


Figura 6 – Representação esquemática dos (a) domínios [Petitpas (2001)] e (b) subdomínios [Fleury et al. (1997b)] estruturais de HSA, onde o subdomínio IIA possui o único resíduo de triptofano (Trp²¹⁴) desta proteína.

AZT é um ligante típico e específico do sítio IIIA, sendo varfarina um ligante IIA. Nem AZT, nem varfarina exibem atividade óptica induzida, quando complexados com HSA. Todavia, a interação de Camptotecina (CPT) com HSA aumenta drasticamente a atividade óptica inerente de CPT. Portanto, segundo Fleury e colaboradores, a competição entre CPT e AZT ou varfarina com HSA pode ser monitorada por dicroísmo circular, de forma a descobrir qual o sítio de ligação de CPT na proteína [Fleury et al. (1997b)].

Fleury e colaboradores observaram que a titulação do complexo CPT-11 com AZT não induziu mudanças nos espectros de dicroísmo circular do complexo CPT-HSA e,

portanto, CPT não interage com o sítio do subdomínio IIIA [Fleury et al. (1997b)]. Em contrapartida, a varfarina provocou alterações nos espectros de dicroísmo circular do complexo CPT-HSA, indicando que CPT compete com varfarina pelo sítio do subdomínio IIA de HSA.

Estes autores também observaram que o espectro de dicroísmo circular do complexo CPT-HSA é praticamente idêntico ao de HSA. Portanto, a interação com CPT não induz mudanças significativas na estrutura secundária de HSA [Fleury et al. (1997b)]. Tal conclusão foi confirmada por estes autores com análise espectroscópica Raman. Entretanto, a complexação com CPT proporciona uma pequena alteração conformacional na proteína, conforme dados de espectroscopia Raman. Os autores sugerem que as duas pontes de dissulfeto existentes no pequeno *loop* duplo (hélices h4-h5 e h5-h6) sofrem alteração conformacional após a complexação de CPT. Tal suposição provém da mudança conformacional mais compacta, *gauche-gauche-gauche*, para configurações mais estendidas *gauche-gauche-trans* e *trans-gauche-trans* que, provavelmente, favorecem maior liberdade conformacional aos domínios estruturais da proteína. Esta rotação relativa dos domínios pode explicar a transferência do único resíduo do aminoácido triptofano existente na proteína (Trp²¹⁴), localizado na hélice h4 do subdomínio estrutural IIA (Figura 6), de um ambiente mais hidrofóbico para outro mais hidrofílico [Fleury et al. (1997b)].

IV.2. Interação de CPT-11 com HSA (30mg/mL): simulação das condições fisiológicas

HSA possui grande afinidade por moléculas hidrofóbicas pequenas, carregadas negativamente. Desta forma, é importante considerar que HSA é o principal carregador de muitos fármacos, que possuem solubilidade limitada no sangue. Neste contexto, considerando a família de compostos derivados de Camptotecina, HSA pode ou não proporcionar a estabilidade e o direcionamento do fármaco.

HSA liga-se preferencialmente à forma hidrolizada (carboxilato) de Camptotecina e de 9-aminocamptotecina, do que à forma lactona. Esta forte interação com a forma carboxilato resulta na ruptura rápida e completa do anel de lactona na presença de HSA (>99,5% para 9-aminocamptotecina) [Mi and Burke (1994a)], [Fleury et al. (1997b)]. Comparações sobre a estabilidade do fármaco em plasma e em albumina de soro purificada revelaram que a abertura do anel de lactona ocorre em maior extensão em

amostras de HSA do que de outras espécies. Além disso, CPT interage mais fracamente com albuminas de soros de espécies não-humanas do que com HSA [Fleury et al. (1997b)]. Portanto, a questão da interação de CPT com os componentes do sangue, particularmente com HSA, parece ser de extrema importância, se o problema de direcionamento do fármaco ao alvo for considerado.

Segundo Mi e Burke, HSA aparenta ser incapaz de ligar-se preferencialmente com a forma carboxilato de CPT-11, Topotecan e o metabólito SN-38, interagindo com a forma lactona, resultando, assim, na estabilidade desses fármacos na presença de HSA [Mi and Burke (1994a)]. Com isso, esta parte do trabalho pretende avaliar se existe a estabilização da forma lactona de CPT-11 na presença de HSA e se ocorrem mudanças na estrutura secundária da proteína, devido à sua interação com CPT-11.

Inicialmente foram realizados os experimentos de cinética de hidrólise de CPT-11 na presença de HSA a 30mg/mL para simular as condições fisiológicas do plasma sangüíneo humano. Para tanto, foram utilizadas soluções de CPT-11 a $1,00 \cdot 10^{-6}$ mol/L nos tampões lactato (pH 4) e fosfato (pH 7), ambos a 0,010 mol/L, na ausência (Figura 7(a)) e na presença de HSA a 30mg/mL (Figura 7(b)) a 37°C por 180min.

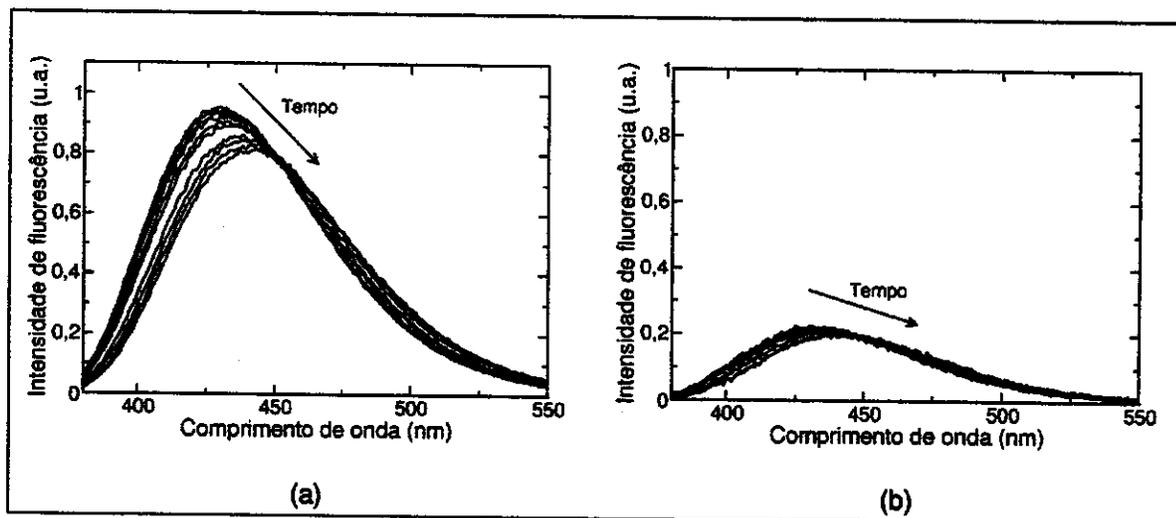


Figura 7 – Espectros de fluorescência de CPT-11, em função do tempo, a $1,00 \cdot 10^{-6}$ mol/L a 37°C, $\lambda_{exc}=370$ nm, em tampão fosfato (pH 7) por 180min na (a) ausência e na (b) presença de HSA (30mg/mL).

Nos espectros de emissão de CPT-11 em tampão lactato (dados não mostrados) não houve mudanças significativas no perfil e na posição da banda espectral, pois, em meio ácido, o anel de lactona não sofre hidrólise. De forma análoga, os espectros de

CPT-11 em tampão lactato na presença de HSA não apresentaram alterações no perfil e na posição da banda. No entanto, estes espectros apresentaram uma diminuição na intensidade de emissão em relação aos espectros de CPT-11, devido à supressão de fluorescência de CPT-11, causada pela alta concentração de albumina.

Já os espectros do composto em tampão fosfato (pH 7) na ausência e presença de HSA (Figura 7) apresentaram deslocamento espectral para a região do vermelho (*red shift*), bem como a presença de um ponto isostilbico¹, indicando a existência de duas espécies fluorescentes em equilíbrio, ou seja, as formas lactona e carboxilato (espécie hidrolizada). Apenas analisando estes gráficos, não é possível estimar o espectro de cada espécie, ou seja, os espectros puros das formas lactona e carboxilato, nem o perfil temporal das concentrações.

Com o objetivo de realizar a deconvolução dos espectros das duas substâncias em tampão fosfato, ou seja, das formas lactona e carboxilato de CPT-11, foi utilizado o método quimiométrico de Lawton e Sylvestre [Lawton and Sylvestre (1971)], separadamente em cada experimento (vide **seção III.3**). Esta técnica permite obter as concentrações dos dois compostos, para cada tempo de reação t_i , e seus respectivos espectros, em concentração unitária, a partir dos espectros da mistura nos vários tempos t_i . Para tanto, este método utiliza a Análise de Componentes Principais, através de uma ferramenta matemática conhecida como Decomposição do Valor Singular (SVD) [Jolliffe (1986)], [Booksh and Kowalski (1994)], [Wold et al. (1987)]. A Figura 8 mostra (a) os espectros de emissão normalizados com concentração unitária e (b) os respectivos perfis temporais de concentração relativa normalizada.

Os resultados espectrais com CPT-11 em tampão fosfato na ausência de HSA indicam que realmente existem duas substâncias distintas, ou seja, o fármaco na forma lactona (—, Figura 8) e a na forma carboxilato (—, Figura 8) proveniente da hidrólise. Na presença de HSA, uma nova espécie (—, Figura 8) é formada, devido à rápida complexação entre HSA e a forma lactona, produzindo um espectro diferente ($\lambda_{\text{máx}} = 426\text{nm}$) comparado com o espectro da forma lactona livre ($\lambda_{\text{máx}} = 421\text{nm}$). Entretanto, tal complexo também pode hidrolizar para a forma carboxilato (—, Figura 8), que não interage com HSA. Assim, propomos um mecanismo, conforme pode ser visto no

1 É o comprimento de onda no qual a fluorescência total não se altera durante uma reação química ou mudança física de uma dada amostra (análogo ao ponto isobéstico para absorvância) [Verhoeven (1996)].

Esquema 1.

De acordo com Mi e Burke, HSA interage com a forma lactona de CPT-11, resultando na estabilidade do fármaco na presença desta proteína [Mi and Burke (1994a)]. No entanto, nossos resultados mostram que não existe tal estabilização da forma lactona, haja visto que o complexo lactona-HSA hidroliza, produzindo a forma carboxilato, terapeuticamente inativa. Tal mecanismo só foi possível de ser elucidado via o tratamento dos dados com quimiometria.

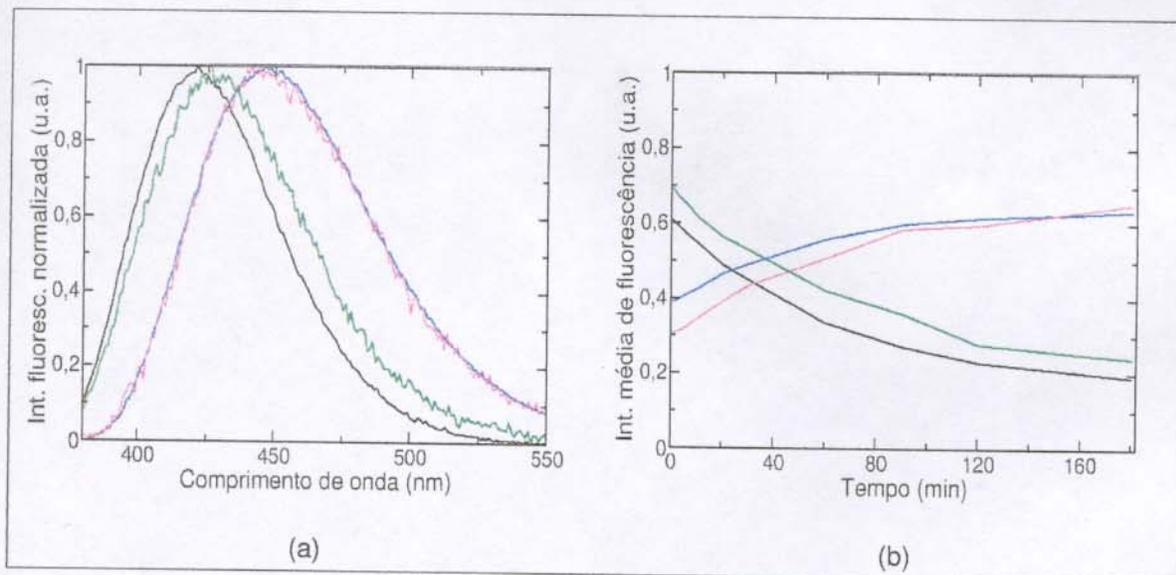
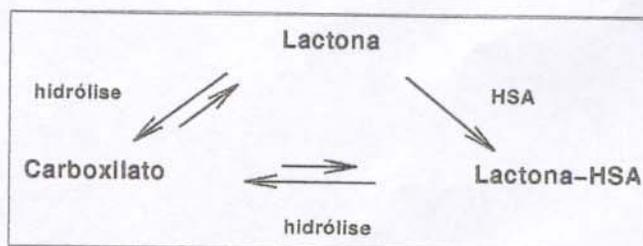


Figura 8 – (a) Espectros de fluorescência resolvidos e normalizados e (b) intensidade média de fluorescência em função do tempo em tampão fosfato (pH 7) de: (—) forma lactona; (—) forma carboxilato; (---) forma lactona com HSA (30mg/mL); e (---) forma carboxilato com HSA (30mg/mL).



Esquema 1 – Equilíbrio das espécies de CPT-11 existentes em pH 7.

Para observar alterações na estrutura secundária de HSA, monitoramos a fluorescência do único resíduo de aminoácido triptofano existente em HSA. Este

monitoramento pôde ser realizado, utilizando uma cubeta de quartzo triangular, que elimina problemas de supressão da fluorescência do triptofano pela alta concentração da proteína.

HSA possui um resíduo de triptofano e 18 resíduos de tirosina, onde somente existem um resíduo de tirosina e o único de triptofano no subdomínio IIA, capazes de sofrer interação com CPT-11. Para evitar a excitação dos outros 17 resíduos de tirosina, foi utilizado neste experimento o comprimento de onda de excitação de 295nm. Observou-se que não houve mudanças espectrais significativas durante 115 min de cinética (dados não mostrados). Os dados quimiométricos indicaram a presença de dois compostos fluorescentes, possivelmente os resíduos de tirosina e de triptofano, presentes no subdomínio IIA (Figura 9), mas que não são incomodados pela presença/ausência de CPT-11 no sítio, já que não há mudanças na intensidade média de fluorescência de ambos os resíduos e, conseqüentemente, não há mudanças conformacionais. Desta forma, pode-se concluir que, embora exista a interação entre CPT-11 e HSA (30mg/mL), esta interação não causa mudanças na estrutura secundária da proteína.

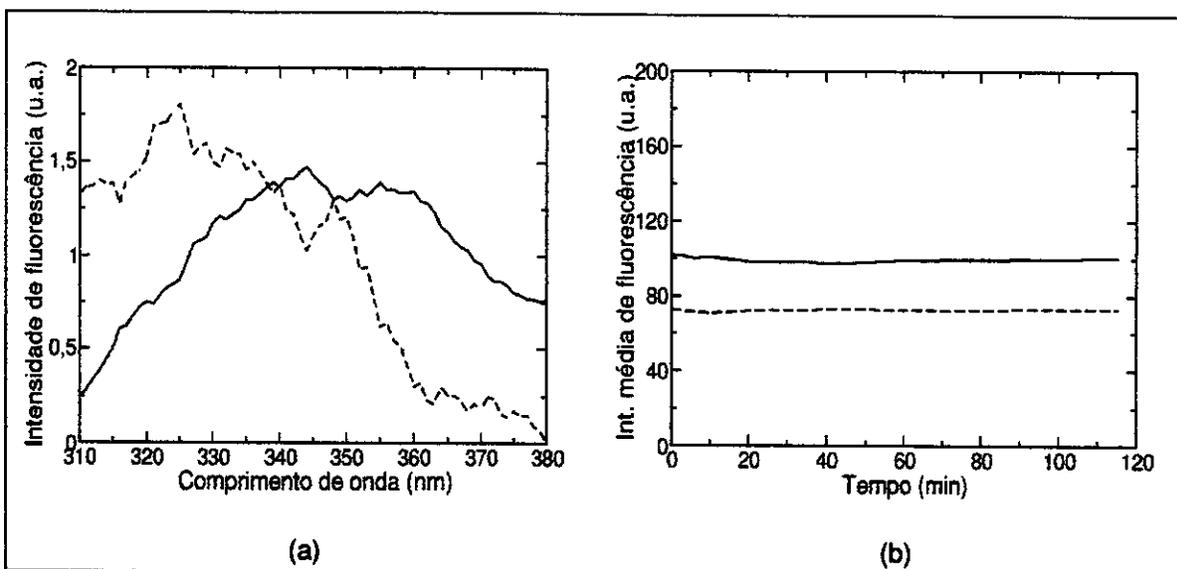


Figura 9 – (a) Espectros de fluorescência resolvidos e (b) perfis da intensidade média de fluorescência em função do tempo de tirosina (– –) e triptofano (—) presentes no subdomínio IIA da proteína HSA (30mg/mL), em solução contendo CPT-11 em tampão fosfato (pH 7) a 37°C, $\lambda_{exc}=295\text{nm}$, por 115min.

IV.3. Interação de CPT-11 com HSA em baixa e média concentrações (0,3mg/mL e 3mg/mL)

Inicialmente, a intenção deste trabalho era comparar os resultados obtidos por espectroscopia de emissão com dados de dicroísmo circular, sendo possível avaliar apenas as mudanças conformacionais na estrutura de CPT-11 (que contém um centro quiral). Conforme discutido anteriormente [Fleury et al. (1997b)], a estrutura secundária de HSA não sofre alterações. No entanto, os experimentos envolvendo dicroísmo circular devem ser realizados com baixa concentração de HSA (0,3mg/mL, que corresponde a aproximadamente $1,00 \cdot 10^{-6}$ mol/L). Assim, antes de realizar os estudos com dicroísmo circular, fizemos um estudo sobre emissão de fluorescência envolvendo CPT-11 com HSA a 0,3mg/mL para verificar se a formação de complexo lactona-HSA ocorre nestas condições e com estequiometria 1:1, como afirmaram Mi e Burke [Mi and Burke (1994a)].

Monitoramos a emissão de CPT-11 ($\lambda_{exc}=370$ nm) em soluções de HSA a 0,3mg/mL e 3mg/mL, (dados não mostrados), como no experimento mostrado na Figura 7(b), com, respectivamente, estequiometrias 1:1 e 10:1 de HSA:CPT-11. Com o tratamento quimiométrico destes experimentos (dados não mostrados), observamos que não há mudanças espectrais significativas, ou seja, a forma lactona na presença de HSA em ambas concentrações possui um espectro semelhante ao da forma lactona livre, na ausência de HSA. Portanto, pode-se concluir que, em baixas concentrações (0,3 e 3mg/mL), a albumina não interage com a forma lactona de CPT-11 e, conseqüentemente, os experimentos de dicroísmo circular não poderão avaliar a interação lactona-HSA com estequiometria 1:1. Apesar de Mi e Burke terem afirmado que a estequiometria seja 1:1, observamos ser necessário um excesso de HSA para deslocar o equilíbrio para a formação do complexo.

Embora não haja interação em baixas concentrações da proteína e, conseqüentemente, não existam modificações na estrutura secundária de HSA, monitoramos a emissão de fluorescência do único resíduo de aminoácido triptofano existente em HSA ($\lambda_{exc}=295$ nm), como no experimento mostrado na Figura 9. Analogamente, observou-se que não houve mudanças espectrais significativas durante a cinética (dados não mostrados), indicando não haver mudanças conformacionais detectáveis.

Com isso, conclui-se que, em estequiometrias 10:1 e 1:1 de HSA:CPT-11, a

albumina não interage com a forma lactona de CPT-11.

Em seguida, realizamos experimentos com dicroísmo circular. Não podemos afirmar que esta técnica seja capaz de observar se houve ou não alterações na estrutura secundária global de HSA, pois os experimentos foram realizados com HSA:CPT-11 na razão 10:1 e sabemos que nestas concentrações não existe interação entre eles. Como não é possível monitorar HSA:CPT-11 na razão 100:1 usando a técnica de dicroísmo, então ela não é capaz de dar informações sobre a interação HSA:CPT-11.

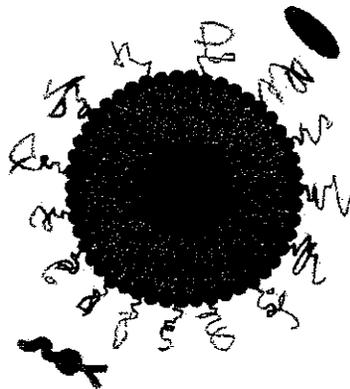
IV.4. Conclusão

Propusemos um mecanismo de reação entre CPT-11 e albumina (HSA). O tratamento quimiométrico dos dados espectroscópicos indicaram que, na presença de HSA em concentração similar à encontrada em condições fisiológicas (30mg/mL), uma nova espécie é formada, devido à rápida complexação entre HSA e a forma lactona, produzindo um espectro diferente, comparado com o da forma lactona livre. Entretanto, observamos que este complexo também é passível de hidrólise, em oposição a resultados anteriores da literatura, que afirmaram a estabilidade do fármaco na presença de HSA [Mi and Burke (1994a)]. Tal mecanismo só foi possível de ser elucidado via o tratamento dos dados com a quimiometria, demonstrando a utilidade desta técnica.

Experimentos utilizando estequiometrias 1:1 e 10:1 de HSA e CPT-11 (a 0,3 e 3mg/mL) foram realizados com o objetivo de comparar os resultados obtidos por espectroscopia de emissão com dados de dicroísmo circular, realizados com baixa concentração de HSA (0,3mg/mL) e de verificar se a formação de complexo lactona-HSA ocorreria nestas condições, como afirmaram Mi e Burke [Mi and Burke (1994a)]. Estes experimentos indicaram a ausência de interação entre o anel de lactona e HSA. Com isso, conclui-se que, em estequiometrias 1:1 e 10:1, a albumina não interage com a forma lactona de CPT-11 e, conseqüentemente, os experimentos de dicroísmo circular não podem (a esta concentração de HSA) avaliar tal interação.

Parte II

**Encapsulamento e caracterização
de CPT-11 em lipossomas
estericamente estabilizados**



Capítulo V

Lipossomas: introdução

A tecnologia envolvida na obtenção de novos medicamentos para tratamento dos diversos tipos de câncer teve grande desenvolvimento e continua em evolução. Porém, a forma de administração destes fármacos aos pacientes ainda é relativamente primitiva e pouco eficiente, produzindo vários efeitos colaterais indesejáveis e danosos ao organismo. De modo geral, estes fármacos são muito tóxicos, exigindo que a dose a ser administrada seja mínima, para não causar danos aos tecidos saudáveis e, ao mesmo tempo, suficiente para atingir as células alvo e exercer o efeito terapêutico, após ser diluído no sangue, absorvido por outros tecidos ou excretado.

Teoricamente, um dos objetivos básicos da quimioterapia é direcionar a substância medicinal específica e eficientemente ao local da doença ou distúrbio. Algumas vezes, isto pode ser conseguido pela administração do fármaco em forma pura. Em muitos casos, entretanto, a eficácia do fármaco pode ser melhorada, associando-o a algum tipo de carregador. Idealmente, este deverá direcionar o fármaco em concentração adequada e apenas no local onde é necessário, evitando a perda do fármaco e a ocorrência de efeito colaterais.

Lipossomas [Lasic (1993)], [New (1989)], vesículas lipídicas onde uma fase aquosa é totalmente cercada por uma ou mais bicamadas de fosfolípidios, são importantes para a encapsulação e liberação controlada de fármacos *in vivo*. Eles podem encapsular substâncias hidrofílicas em seu cerne aquoso e hidrofóbicas e anfífilas em suas bicamadas. Estes sistemas têm sido testados, com sucesso, como transportadores de

diversos fármacos, vacinas, material genético e enzimas para o interior de células. Apresentam baixa toxicidade e imunogenicidade, são biodegradáveis e capazes de proteger os compostos encapsulados da diluição e degradação no sangue, de forma que, quando alcançam os tecidos alvo, podem liberar doses concentradas do fármaco, aumentando a eficácia do tratamento. Os lipossomas modificam as propriedades farmacocinéticas, o tempo de trânsito na circulação sanguínea e o metabolismo do fármaco encapsulado [Lasic (1993)], [New (1989)].

Lipossomas são normalmente preparados a partir de lecitinas extraídas de fontes naturais ou a partir de fosfolipídios sintéticos. Em alguns casos são propositadamente adicionados outros lipídios, como colesterol, para aumentar a estabilidade física ou modificar suas propriedades. Em particular, o colesterol não só aumenta a estabilidade mecânica como reduz o vazamento de substâncias que são incorporadas nas vesículas [Lasic (1993)].

Existem vários tipos de lipossomas, classificados de acordo com o tamanho e o número de bicamadas lipídicas que apresentam. As vesículas formadas por diversas bicamadas sucessivamente separadas por compartimentos fluidos são chamadas de multilamelares (MLV). Estes lipossomas são preparados a partir da hidratação de um filme lipídico seco. As vesículas que apresentam apenas uma bicamada e uma região aquosa central são denominadas unilamelares e podem ser pequenas (SUV) ou grandes (LUV) [Lasic (1993)], [New (1989)]. Os lipossomas LUV podem ser preparados a partir da extrusão de lipossomas MLV.

A Figura 10 mostra o esquema de um lipossoma multilamelar. Este tipo de vesícula possui muitas bicamadas (ou lamelas). Na ampliação, podemos visualizar a composição de uma bicamada. Basicamente a estrutura de uma bicamada é composta por fosfolipídios (azul) e colesterol (laranja), que pode encapsular tanto substâncias hidrofóbicas (azul marinho) e anfifílicas (verde), quanto estruturas maiores como proteínas globulares (roxa). No cerne aquoso, bem como na solução aquosa existente entre bicamadas, substâncias hidrofílicas (amarela) podem ser incorporadas.

Lipossomas com longo tempo de circulação possuem farmacocinética que independe da dose e tem menor reconhecimento pelos componentes do sistema fagocitário mononuclear e melhor eficiência no direcionamento de fármaco a tumores que lipossomas convencionais. Quando tais lipossomas contêm lipídios conectados a polietilenoglicol (PEG), são designados como lipossomas Stealth² ou lipossomas

2 Stealth[®] é marca registrada da empresa SEQUUS Pharmaceuticals, Inc., Menlo Park, CA.

estericamente estabilizados, com base no aumento da estabilidade *in vivo* e da reduzida reatividade com proteínas plasmáticas e receptores celulares de superfície, responsáveis pela sua degradação [Lasic (1993)]. O polímero PEG proporciona uma barreira estérica hidrofílica que, após a solvatação, impede a interação da superfície do lipossoma com proteínas (opsoninas) do plasma e, conseqüentemente, com os macrófagos evitando o seu reconhecimento e a sua remoção rápida [Lasic (1993)].

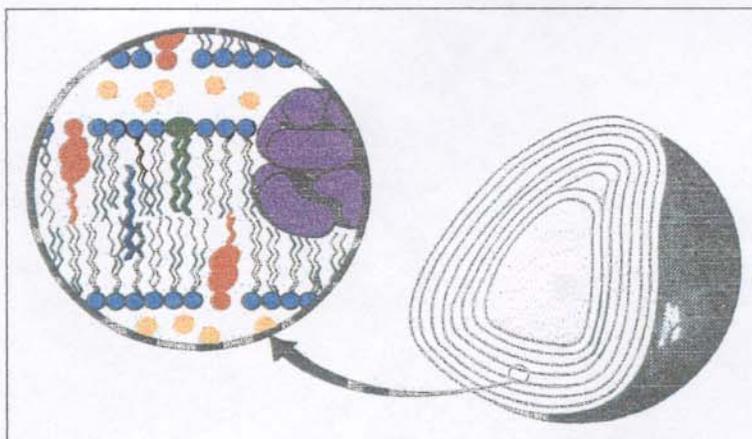


Figura 10 – Representação esquemática de um lipossoma multilamelar (MLV) [Fendler (1982)].

A Figura 11 traz uma representação esquemática da interação entre lipossomas convencionais e Stealth com lipoproteínas e proteínas do sistema fagocitário mononuclear, como as opsoninas. As lipoproteínas presentes no plasma sanguíneo desestabilizam os lipossomas convencionais. As moléculas do sistema fagocitário mononuclear, conhecidas como opsoninas, são adsorvidas na superfície de lipossomas convencionais, agindo como sinalizadores que identificam os lipossomas como corpos estranhos, facilitando sua fagocitose e destruição pelos macrófagos. Nos lipossomas Stealth, as longas cadeias de polietilenoglicol, que estão em sua superfície, dificultam a adsorção de moléculas na superfície das vesículas. Desta forma, os lipossomas Stealth são capazes de passar despercebidos pelo sistema fagocitário mononuclear, permanecer por tempos prolongados na corrente sanguínea e podem ser direcionados para outros sítios do organismo [Lasic (1993)].

Dados da literatura indicaram que os melhores resultados, em termos de grandes concentrações de lipossomas no sangue combinados com o elevado tempo de circulação, foram obtidos com lipossomas preparados com DSPE-PEG a uma porcentagem molar de 5 a 10%, com massa molar média de PEG de 2000 Daltons [Zalipsky (1995)], [Jones (1995)]. Para baixas massas molares de PEG (< 1000

Daltons), o tempo de circulação destes lipossomas diminui e sua captura pelo SFM aumenta [Marjan and Allen (1996)].

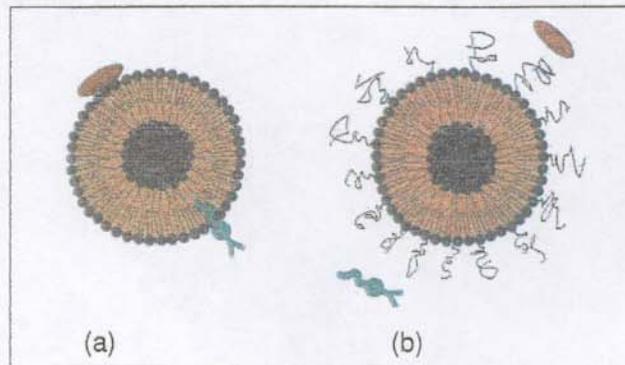


Figura 11 – Representação esquemática da interação entre (a) lipossomas convencionais e (b) lipossomas Stealth com lipoproteínas (oval) e anticorpos como a opsonina (formato de Y) [Lasic (1993)].

A natureza de lipídios em bicamadas lipídicas também é importante. A estabilidade da partícula depende do balanço entre as forças atrativas entre cadeias hidrofóbicas na bicamada lipídica e as repulsivas presentes nas cabeças dos fosfolipídios, e cadeias de PEG associadas. Este fato sugere que a mistura de lipídios saturados (no estado gel), como DSPC, com colesterol pode constituir em uma composição otimizada para lipossomas Stealth [Hristova and Needham (1995)].

Desta forma, a encapsulação de CPT-11 em lipossomas LUVs estericamente estabilizados (100nm), com meio ácido em seu interior, pode constituir em uma opção para diminuir a hidrólise do anel de lactona e a interação com a albumina, bem como aumentar a capacidade terapêutica e a farmacocinética do fármaco. É isso que pretendemos nesta parte do trabalho.

Capítulo VI

Lipossomas: tentativas experimentais

Este capítulo aborda o segundo objetivo deste trabalho, que é encapsular o fármaco CPT-11 em lipossomas estericamente estabilizados para manter sua integridade, evitando sua hidrólise. São mostrados os resultados experimentais obtidos e a discussão sobre as características físico-químicas dos lipossomas, bem como as dificuldades encontradas no trabalho.

VI.1. Estudo fotofísico de CPT-11 encapsulado em lipossomas estericamente estabilizados (CPT-11:LUV)

Sabe-se que o anel de lactona é estável em pH 5,0, no qual menos que 5% do fármaco é convertido à forma carboxilato, no equilíbrio [Burke and Gao (1994)]. Portanto, a encapsulação de CPT-11 a baixos valores de pH em bicamadas lipídicas, capazes de manter um gradiente transmembrânico de pH por longos períodos de tempo, pode estabilizar a forma lactona.

No início do nosso trabalho, tínhamos a intenção de usar lipossomas unilamelares (LUV) convencionais preparados com fosfatidilcolina (PC) de soja (Epikuron 200SH, Lucas Meyer) e colesterol na proporção 3:1 (m/m) em tampão lactato a pH 4. Acreditávamos que um sistema muito simples, utilizando lipossomas convencionais, seria adequado para manter a integridade do composto na forma lactona. Entretanto, de acordo com os experimentos de cinética de hidrólise monitorados por espectroscopia de

emissão de fluorescência (conforme procedimento citado na **seção IV.2**), este sistema lipossomal não impede a hidrólise de CPT-11. Uma possível solução seria usar lipossomas estericamente estabilizados (Stealth), feitos com DMPE-PEG. Imaginamos que o PEG, por ser hidrofílico, reteria muitas moléculas de água, de forma que possivelmente o gradiente de pH existente na membrana se mantivesse. De acordo com Sadzuka e colaboradores, lipossomas estericamente estabilizados possuem maior tempo de meia vida na corrente sangüínea e melhor eficiência no direcionamento de fármaco a tumores do que lipossomas convencionais, para o sistema envolvendo o CPT-11, embora tais autores não tenham determinado a porcentagem de CPT-11 hidrolizado [Sadzuka et al. (1997)]. Acreditamos que eles sejam melhores, não somente pelos fatos mencionados (dado que o PEG proporciona uma barreira hidrofílica estérica que reduz a interação das opsoninas presentes no plasma com a superfície do lipossoma [Burke and Gao (1994)]), mas porque, provavelmente, tais lipossomas evitem a hidrólise de CPT-11, proporcionando, portanto, maior concentração de SN-38 (metabólito terapeuticamente ativo do CPT-11) não-hidrolizado nos tumores.

Devido a estes fatores, achamos mais conveniente utilizar lipossomas estericamente estabilizados para encapsular CPT-11. Consequentemente, alteramos a formulação lipossomal, utilizando vesículas de lipossomas estericamente estabilizados, constituídos pelos fosfolipídios sintéticos diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE) e DMPE-PEG 2000 (sintetizados conforme procedimento da literatura [Woodle et al. (1991)], [Ribas (1997)]), e colesterol (CPT-11:LUV).

Vários experimentos foram realizados utilizando lipossomas Stealth contendo DSPC, colesterol, DMPE-PEG 2000 (com ou sem DMPE) e verificou-se que tais formulações não conseguiam evitar a hidrólise de CPT-11, pois não são capazes de manter um gradiente transmembrânico de pH.

Em correspondências pessoais com a Dra. Theresa M. Allen (Universidade de Alberta, Edmonton, Canadá), ela sugeriu o uso de DSPE-PEG 2000 para manter uma boa estabilidade física das vesículas. Segundo a Dra. Allen, o emprego de DMPE-PEG pode causar instabilidade mecânica ao lipossoma, pois (1) o PEG sai facilmente e (2) pode haver uma separação de fases entre DSPC e DMPE-PEG. Essa pode ser a razão pela qual os lipossomas não conseguiam manter um gradiente de pH. Assim, DMPE-PEG 2000 foi substituído por DSPE-PEG 2000 na formulação lipossomal.

Lipossomas Stealth contendo CPT-11 (CPT-11:LUV) foram preparados em tampão lactato (pH 4,0) a 0,010mol/L com 10% de sacarose (m/v), utilizando DSPC, DSPE-PEG

2000 e colesterol. Os comportamentos fotofísicos de CPT-11 livre e incorporado nessas vesículas foram estudados a partir da cinética de hidrólise do fármaco em tampão HEPES (pH 7,4) a 0,010mol/L com 10% de sacarose (m/v), monitorada pelos espectros de emissão de fluorescência em função do tempo. Os espectros de fluorescência de CPT-11 livre (monitorados por 280min, a 37°C) e CPT-11:LUV (420min, a 19°C) são mostrados na Figura 12.

O deslocamento da banda de fluorescência para a região do vermelho, observado na Figura 12(a), indica o aumento da espécie carboxilato. Por outro lado, quase não há deslocamento espectral no espectro mostrado na Figura 12(b), mesmo por 420min (7h).

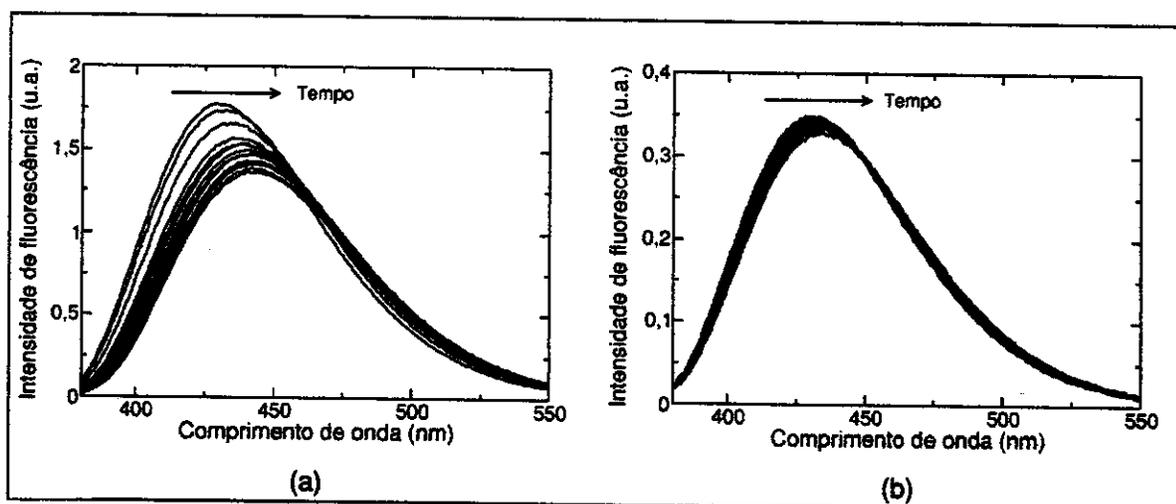


Figura 12 – Espectros de fluorescência, em função do tempo, em tampão HEPES (pH 7,4) a 0,010mol/L com 10% de sacarose (m/v), $\lambda_{exc}=370\text{nm}$, de: (a) CPT-11 livre (por 280min, a 37°C) e (b) CPT-11:LUV (por 420min, a 19°C).

Com o objetivo de realizar a deconvolução dos espectros das duas substâncias em tampão HEPES, ou seja, das formas lactona e carboxilato de CPT-11 livre e encapsulado, foi utilizado o método quimiométrico de Lawton e Sylvestre [Lawton and Sylvestre (1971)], conforme descrito na seção III.3. A Figura 13 mostra os espectros de emissão de fluorescência resolvidos e normalizados e a Figura 14 mostra os perfis da intensidade média de fluorescência em função do tempo da forma lactona de CPT-11 (—), da forma carboxilato de CPT-11 (—), da forma lactona de CPT-11:LUV (—) e da forma carboxilato de CPT-11:LUV (—), em tampão HEPES (pH 7,4) a 0,010mol/L com 10% de sacarose (m/v).

Os resultados espectrais com CPT-11 livre (Figura 13) indicam que realmente

existem duas substâncias distintas, ou seja, o fármaco na forma lactona (—) e a na forma carboxilato (—) proveniente da hidrólise, como vimos na **seção IV.2**. Encapsulada em lipossomas, a forma lactona (Figura 13,—) possui um espectro ligeiramente deslocado ($\lambda_{\text{máx}}= 428\text{nm}$), comparado com o espectro da forma lactona livre ($\lambda_{\text{máx}}= 423\text{nm}$). Como esta banda corresponde a uma transição $\pi-\pi^*$, este deslocamento para a região do vermelho indica que o fluoróforo encontra-se em um ambiente mais polar. Este fato parece-nos contraditório, pois esperávamos que, em lipossomas, o fluoróforo produzisse um deslocamento para a região do azul, dado que as bicamadas lipídicas possuem uma natureza mais hidrofóbica, devido à presença de cadeias acila. Poder-se-ia pensar que existe a saída do fluoróforo de lactona das bicamadas lipídicas, mas esta hipótese produziria um espectro semelhante ao espectro de lactona livre, já que ele estaria em solução aquosa, como a lactona livre. Pode-se supor que o fluoróforo da forma lactona encapsulada interaja com as cabeças polares do grupo fosfato, através de uma interação íon-dipolo induzido, sendo esta interação mais intensa que a interação de ligação de hidrogênio entre o fluoróforo livre e as moléculas de água presentes em solução. Desta forma, como a interação íon-dipolo induzido é mais intensa, neste caso seria "mais polar" e este fato explicaria o deslocamento para a região do vermelho.

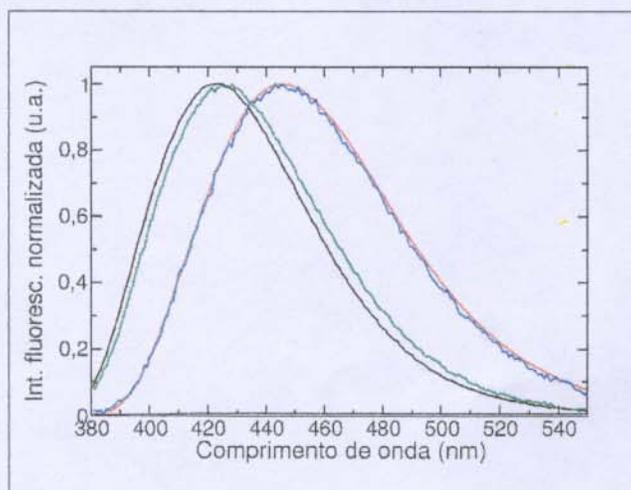


Figura 13 – Espectros de fluorescência resolvidos e normalizados em tampão HEPES (pH 7,4) a 0,010mol/L com 10% de sacarose (m/v) das formas lactona (—) e carboxilato (—) de CPT-11, e das formas lactona (—) e carboxilato (—) de CPT-11:LUV.

Já a forma carboxilato em lipossomas (Figura 13,—) possui um espectro semelhante ao de carboxilato livre e podemos supor que (1) o fluoróforo não está incorporado nas

bicamadas lipídicas, ou (2) o fluoróforo não é sensível a mudanças de polaridade. Este fato foi elucidado com medidas de grau de anisotropia de fluorescência.

Avaliando os perfis de intensidade média de fluorescência das espécies lactona e carboxilato (Figura 14 e Tabela 1), observa-se que a forma lactona facilmente hidroliza em solução aquosa, mas foi estabilizada em lipossomas Stealth, pois até 420min o equilíbrio não foi atingido, sendo o decaimento da intensidade média de fluorescência apenas de 27,2% em 7h.

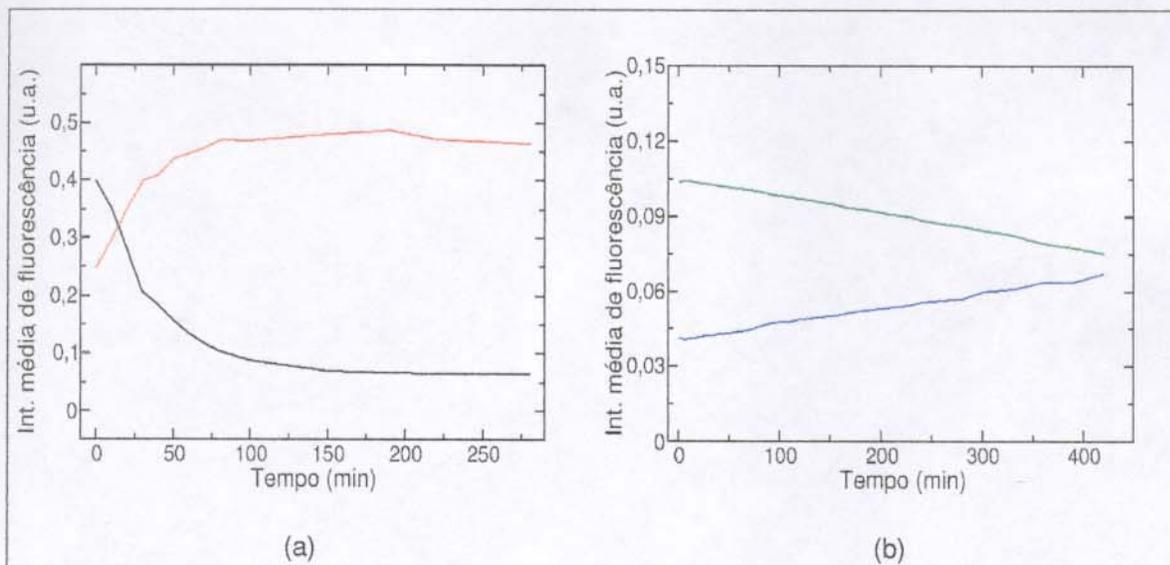


Figura 14 – Perfis da intensidade média de fluorescência em função do tempo, em tampão HEPES (pH 7,4) a 0,010mol/L com 10% de sacarose (m/v) da (a) forma lactona (—) e da forma carboxilato (—) de CPT-11 e (b) da forma lactona (—) e da forma carboxilato (—) de CPT-11:LUV.

O experimento com CPT-11:LUV foi realizado a 19°C e 37°C, mas infelizmente a hidrólise do anel de lactona ocorreu a 37°C, provavelmente devido à elevação da permeabilidade da bicamada. Apesar disso, não houve liberação de fármaco a partir dos lipossomas, verificado por medidas de grau de anisotropia de fluorescência.

O grau de anisotropia pode fornecer informações sobre o ambiente onde o fluoróforo se encontra. Esta técnica revela o deslocamento angular médio do fluoróforo que ocorre entre a absorção e a subsequente emissão de um fóton, de acordo com o ambiente onde o fluoróforo se encontra [Lakowicz (1983)]. A Tabela 2 mostra as medidas de grau de anisotropia de fluorescência no estado estacionário (r) para CPT-11 livre e encapsulado nos tampões lactato (pH 4,0) e HEPES (pH 7,4, após 60min) a 0,010mol/L

com 10% de sacarose (m/v). (Observação: as medidas de grau de anisotropia de CPT-11:LUV foram realizadas após 7 dias de preparo desta formulação, não sendo notada a presença de fungos, que poderiam comprometer o experimento.)

Tabela 1 – Decaimento da intensidade média de fluorescência da forma lactona ($IF_{lactona}$) em CPT-11 livre e encapsulado (CPT-11:LUV) em função do tempo, conforme os resultados apresentados na Figura 14.

| Amostra | Tempo (min) | $IF_{lactona}$ (u.a.) | Decaimento (%) |
|----------------|--------------------|---|-----------------------|
| CPT-11 (livre) | 0 | 0,3993 | – |
| | 280 | 0,0657 | 83,5% |
| CPT-11:LUV | 0 | 0,1036 | – |
| | 280 | 0,0859 | 17,1% |
| | 420 | 0,0754 | 27,2% |

Tabela 2 – Medidas de grau de anisotropia de fluorescência (r) para CPT-11 livre e encapsulado nos tampões lactato (pH 4,0) e HEPES (pH 7,4) a 0,010mol/L com 10% de sacarose (m/v)

| Amostra | Tampão | r |
|----------------|---------------|-----------------------|
| CPT-11 | lactato | 0,046 |
| | HEPES | 0,035 |
| CPT-11:LUV | lactato | 0,088 |
| | HEPES | 0,067 |

O CPT-11 em meio ácido (forma lactona) possui pequeno valor do grau de anisotropia, pois não há impedimento estérico e a molécula tem liberdade rotacional. A forma carboxilato em tampão HEPES possui menor valor, devido à ruptura do anel de lactona, aumentando os graus de liberdade da molécula. Já os valores de r para CPT-11:LUV são superiores, devido ao efeito estérico das cadeias acila, indicando restrição dos movimentos rotacionais, causada pela sua encapsulação na bicamada lipídica.

Portanto, podemos concluir que a hidrólise de CPT-11 encapsulado em lipossomas ocorre devido à migração de prótons H^+ do cerne aquoso para a solução externa, ou seja, à ausência de um gradiente transmembrânico de pH a 37°C. Contudo, é preciso ressaltar que esta primeira formulação lipossomal contendo DSPE-PEG 2000 foi capaz de manter um gradiente transmembrânico de pH, a 19°C.

VI.2. Outras tentativas para manter um gradiente transmembrânico de pH

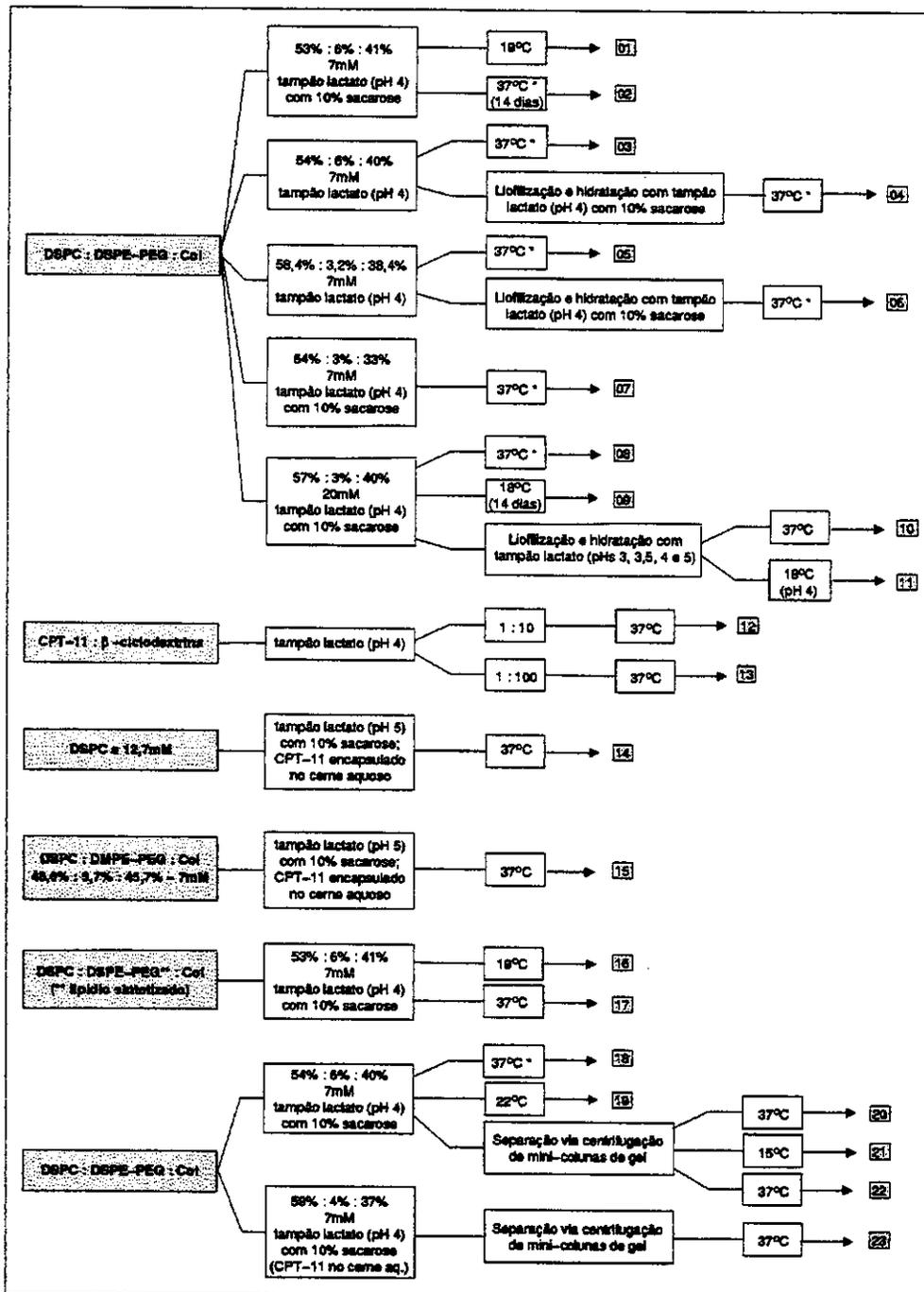
Após o primeiro sucesso experimental, foram realizados vários outros experimentos, na tentativa de obter uma formulação que mantivesse um gradiente transmembrânico de pH. O Esquema 2 mostra um fluxograma dos experimentos realizados.

O primeiro sucesso experimental está indicado no fluxograma como experimento 01. O segundo experimento, utilizando a mesma formulação do primeiro, apresentou alta velocidade de hidrólise. Como este experimento foi realizado duas semanas após o preparo dos lipossomas, a presença de sacarose favoreceu o aparecimento de fungos (invisíveis a olho nu) que, aliado à elevada temperatura, poderiam ter desestabilizado e/ou rompido as vesículas, favorecendo, portanto, o aumento da velocidade de hidrólise. Com isso, apesar da sacarose aumentar a estabilidade física de vesículas [Lasic (1993)], os experimentos seguintes (03 a 06) foram feitos com tampão lactato sem sacarose, dado que a sacarose proporciona a proliferação rápida de fungos e, com isso, diminui o tempo de vida útil dos lipossomas.

Alguns experimentos (marcados com *) também foram realizados na presença de plasma humano. Segundo a Profa. Maria Eugénia Meirinhos da Cruz (INETI, Lisboa, Portugal), é possível que a hidrólise de CPT-11 ocorra mais lentamente quando os lipossomas CPT-11:LUV forem colocados diretamente no plasma humano, já que algumas reações podem não acontecer neste meio, devido à sua composição. Entretanto, os testes realizados em plasma (dados não mostrados) indicaram que a hidrólise ocorre rapidamente, embora com uma velocidade ligeiramente menor que em HEPES.

Na ausência de sacarose, os experimentos 03 a 06 não conseguiram preservar um gradiente de pH, mesmo nas formulações 05 e 06, que foram sugeridas pela Dra. Allen, utilizando apenas 3% de DSPE-PEG 2000.

O experimento 07 foi preparado com sacarose e 3% de DSPE-PEG 2000, conforme sugestão da Dra. Allen. Infelizmente, não houve um gradiente de pH, mas a velocidade de hidrólise de CPT-11 foi menor do que a de lipossomas preparados na ausência de sacarose.



Esquema 2 – Fluxograma dos experimentos realizados, que apresentaram rápida hidrólise de CPT-11, com exceção do experimento 01 que conseguiu manter um gradiente de pH. Todas as proporções indicadas no fluxograma são porcentagens molares. O CPT-11 foi incorporado na bicamada lipídica, durante a formação do filme lipídico, com exceção dos experimentos 12 a 15, 22 e 23. Os experimentos com * foram realizados também na presença de plasma humano.

De acordo com Colbern e colaboradores [Colbern et al. (1998)] e Sadzuka e

colaboradores [Sadzuka et al. (1997)], ambos os trabalhos utilizaram formulações cuja concentração total de lipídios era maior que 20mM, ou seja, quase o triplo da concentração utilizada neste trabalho. Assim, acreditávamos que esta concentração fosse um fator determinante para diminuir a velocidade de hidrólise de CPT-11. Os experimentos 08 a 11 foram preparados com concentração total de lipídios de 20mM, no entanto sem sucesso. Enquanto aguardávamos a chegada de DSPE para sintetizar DSPE-PEG 2000, vários outros experimentos que não utilizavam DSPE-PEG foram realizados.

Conforme o trabalho de Underberg e colaboradores, que trata da encapsulação do fármaco SK&F 104864-A (derivado de Camptotecina) em vários tipos de ciclodextrinas (CD), o anel de lactona fica mais protegido contra a hidrólise quando encapsulado em dimetil- β CD, que diminuiu a velocidade de hidrólise pela metade em relação à β CD, embora essa velocidade seja muito mais rápida que a observada no primeiro experimento usando DSPE-PEG [Underberg et al. (1990)]. Como não temos este tipo de CD, foi utilizada apenas β CD (experimentos 12 e 13). Observou-se que a hidrólise é muito rápida, apenas usando β CD.

Burke e Gao observaram que Topotecan (derivado anifílico de Camptotecina) tem afinidade reduzida por bicamadas lipídicas e encapsularam este composto no cerne aquoso de lipossomas unilamelares de DSPC [Burke and Gao (1994)]. Apesar de Sadzuka e colaboradores [Sadzuka et al. (1997)] acrescentarem CPT-11 durante a preparação do filme lipídico, foram realizados os experimentos 14 e 15, incorporando CPT-11 durante a hidratação, juntamente com o tampão lactato com sacarose. O objetivo destes experimentos foi verificar se as formulações com DSPC e DMPE-PEG eram capazes de manter gradientes de prótons através de bicamadas por longos intervalos de tempo, com este tipo de encapsulação passiva. No entanto, tais formulações também não tiveram sucesso.

Quando DSPE foi obtido, prosseguiu-se com a síntese de DSPE-PEG 2000, conforme procedimento descrito na literatura [Woodle et al. (1991)], [Ribas (1997)], o qual foi caracterizado pelas técnicas de espectroscopia de absorção na região do infravermelho e de ressonância magnética nuclear de H^1 e C^{13} . Como a influência da parte de etileno glicol (proveniente de PEG) no composto sintetizado é muito intensa, os sinais atribuídos ao PEG eram muito intensos em ambas as técnicas, mascarando as contribuições de outras partes da molécula (dados não mostrados). Assim, tais técnicas não foram capazes de caracterizar o composto.

Como a Dra. Allen sugeriu a repetição da primeira formulação, foram preparados lipossomas conforme o primeiro experimento, utilizando o DSPE-PEG 2000 sintetizado. Todavia, as cinéticas de hidrólise de CPT-11:LUV em tampão HEPES a 19°C e 37°C (experimentos 16 e 17 respectivamente) não apresentaram o mesmo comportamento, ou seja, não conseguiram manter um gradiente de pH. De acordo com o resultado obtido no primeiro experimento, sabe-se que esta formulação é capaz de manter um gradiente transmembrânico de pH a 19°C. Com isso, acredita-se que o insucesso seja devido a problemas na síntese de DSPE-PEG, indetectáveis pelas técnicas de caracterização. Assim, decidimos adquirir DSPE-PEG 2000 comercial.

Após a obtenção de DSPE-PEG 2000 comercial, repetimos a primeira formulação (experimentos 18 e 19). Novamente não conseguimos reproduzir o mesmo sucesso experimental da primeira formulação, pois houve a rápida decomposição de CPT-11. *Mas por que isso aconteceu?*

Suspeitamos que a hidrólise rápida do anel de lactona seja devida ao CPT-11 livre em solução. Embora dados sobre os graus de anisotropia estática indiquem a presença de fluoróforo encapsulado nas bicamadas lipídicas dos lipossomas, esta técnica não é capaz de informar a existência de uma fração de fármaco não-encapsulado, livre em solução. Com isso, se houver fármaco livre em solução, este pode provocar mudanças espectrais nos testes cinéticos. Conseqüentemente, a possibilidade da existência de fármaco livre poderia indicar que a técnica de separação de fármaco não-encapsulado (ultrafiltração) não é eficiente. A técnica de ultrafiltração não é muito adequada para algumas composições, principalmente se este processo for lento, como o nosso caso, pois a lentidão pode provocar o deslocamento do fármaco para fora da vesícula. Por isso, achamos conveniente quantificar a fração de fármaco que sai da cela de ultrafiltração, por espectroscopia de absorção. Quando a concentração fosse quase nula, poder-se-ia parar o processo (no entanto, quando isso acontece em processos lentos,

em geral, não há quase fármaco encapsulado).

O experimento 18 foi repetido, monitorando a água de lavagem com espectroscopia de absorção. Após mais de 7h de lavagem, ainda havia liberação de CPT-11 livre, em concentração muito baixa. Isso pode indicar que há deslocamento do equilíbrio para a saída de CPT-11 das vesículas. Com isso, a técnica de ultrafiltração não aparenta ser capaz de garantir uma solução lipossomal isenta de fármaco livre. Portanto, a técnica de separação mais adequada para o nosso caso é a de centrifugação em mini-colunas de cromatografia por exclusão em gel.

Esta técnica está baseada no princípio de separação da cromatografia por exclusão, onde o processo é acelerado pela centrifugação das mini-colunas [Lasic (1993)]. O gel Sephadex é o material mais usado para a separação de lipossomas em colunas por exclusão em gel. O procedimento é exatamente idêntico a aqueles utilizados para desalinização e separação de proteínas, descrito na literatura há muitas décadas [Stryer (1995)]. No caso específico de lipossomas, o gel retém substâncias com determinadas massas molares e elui primeiramente os lipossomas. Além da simplicidade e rapidez, outra vantagem desta técnica é que os lipossomas isentos de fármaco livre podem ser obtidos praticamente sem diluição, já que o fármaco livre fica retido na coluna, enquanto que a solução de lipossomas é recolhida. Esta técnica foi aplicada nos experimentos 20 a 23.

Os experimentos 20 e 21 são a repetição da primeira formulação, mas usando a técnica de separação de centrifugação de mini-colunas de gel. Tais experimento não deram certo, embora soubéssemos que não havia CPT-11 livre em solução lipossomal. Suspeitamos que o anel de lactona de CPT-11 está localizado na interface externa da bicamada lipídica, sendo mais suscetível à hidrólise. Assim, encapsulamos o CPT-11 no cerne aquoso em duas formulações: a mesma e a proposta pela Dra. Terry Allen (experimentos 22 e 23, respectivamente). Em ambos os experimentos, ocorreu a hidrólise do anel de lactona. Como houve encapsulação de CPT-11 no cerne aquoso para ambas as formulações, não existe a possibilidade do anel de lactona de CPT-11 entrar em contato com o meio externo. Portanto, podemos supor que a hidrólise ocorre por migração rápida de prótons.

Para uma maior compreensão do nosso sistema, a questão de como pode ser possível manter um gradiente de prótons em bicamadas lipídicas, como membranas celulares e lipossomas, tem que ser abordada e discutida em profundidade, desde o entendimento dos mecanismos propostos para a migração de solutos, inclusive os

prótons, bem como os artefatos utilizados para evitar a migração de prótons em sistemas que utilizam bicamadas lipídicas. Estes assuntos são abordados no próximo capítulo.

Capítulo VII

Migração de prótons através de bicamadas lipídicas

VII.1. Introdução

O equilíbrio entre a manutenção e a dissipação de gradientes de concentração através de membranas celulares é fundamental para o funcionamento de sistemas biológicos [Paula et al. (1996)]. As células dependem de membranas que proporcionam uma barreira a solutos iônicos, como prótons, íons sódio, potássio e cálcio, de forma a manter um gradiente de íons necessário para funções bioenergéticas, atividade celular nervosa e processos regulatórios. Por exemplo, processos como fosforilação oxidativa e fotossintética exigem membranas que barram a difusão passiva de prótons [Paula et al. (1996)].

Paradoxalmente, as mesmas membranas devem favorecer o fluxo de água, oxigênio e dióxido de carbono, que precisam entrar e sair rapidamente da célula. A própria bicamada lipídica pode atuar como uma barreira semipermeável para as funções descritas acima, mas a maioria das membranas biológicas incorporam sistemas de transporte especializado em suas bicamadas lipídicas para facilitar a captura específica de solutos nutrientes tais como a glicose e aminoácidos. Canais de proteínas, bombas de íons e excreção de metabólitos também podem estar presentes para produzir

gradientes de concentração iônica e potenciais de membrana característicos de processos biológicos [Paula and Deamer (1999)].

O interesse pela permeabilidade de bicamadas de fosfolipídios para cátions iniciou-se no final dos anos de 1960 e início de 1970. As clássicas medidas quantitativas de migração de sódio através de bicamadas lipídicas foram realizadas por Dimitri Papahadjopoulos [Papahadjopoulos (1971)], [Papahadjopoulos et al. (1972)]. Em 1971, ele estabeleceu a permeabilidade para íons potássio, sódio e outros cátions encontrados em sistemas biológicos em uma variedade de vesículas de fosfolipídios (lipossomas). Seus resultados foram confirmados por outros pesquisadores ao longo dos anos [Paula et al. (1996)], [Brunner et al. (1980)], [Mkheian et al. (1981)], [Singer et al. (1980)], [Venema et al. (1993)], [Bonting et al. (1977)].

Papahadjopoulos descobriu que a migração de cátions divalentes é muitas ordens de magnitude menor que a de cátions monovalentes. Além disso, quantidades equimolares de colesterol e fosfatidilserina (PS) reduzem a permeabilidade para íons sódio (Na^+) para um terço do valor de permeabilidade de lipossomas de PS. Em seus estudos, ele estabeleceu que existem dois fatores biologicamente relevantes que afetam a velocidade de migração de cátions: a temperatura e a concentração de colesterol nas bicamadas lipídicas.

Experimentos envolvendo a migração de prótons foram realizados a partir do início dos anos de 1980. Atualmente, o coeficiente de permeabilidade a prótons já está estabelecido como 10^{-5} cm/s [Haines (2001)], que é surpreendentemente maior que o valor de coeficientes para outros cátions ($\sim 10^{-12}$ cm/s). Apesar da disponibilidade destes dados, o modelo de permeabilidade passiva ainda não está claramente compreendido [Paula et al. (1996)].

Embora não se saiba exatamente como os solutos migram por bicamadas lipídicas, a grande questão é saber como se evita esta migração. A partir da análise da composição lipídica de membranas celulares de organismos vivos, Haines observou que membranas plasmáticas de células de animais, ricas em colesterol, utilizam gradientes de Na^+ , e todos os outros organismos vivos, ricos em fitosterol, usam gradiente de prótons [Haines (2001)]. Com isso, Haines concluiu que o fitosterol pode inibir a migração de prótons e, de forma análoga, que o colesterol inibe a migração de Na^+ .

Neste capítulo, discutimos os modelos propostos para a migração de solutos, inclusive os prótons, bem como o que se pode ser feito para evitar tal migração em sistemas que possuem bicamadas lipídicas, como membranas celulares e lipossomas.

VII.2. Modelos de migração de solutos

Nesta seção são apresentados os modelos de migração de solutos em bicamadas lipídicas encontrados na literatura. O modelo de solubilidade-difusão e o modelo de poros transientes foram propostos com base em dados experimentais, segundo fundamentos matemáticos bem estabelecidos. Recentemente, Haines publicou sua hipótese para explicar a migração de prótons em bicamadas lipídicas, contudo sem validar seu modelo com dados experimentais [Haines (2001)].

VII.2.1. Modelo de solubilidade-difusão ³

O modelo de solubilidade-difusão está baseado no fato de que a espécie permeante deve primeiramente particionar-se na região hidrofóbica da membrana, difundir-se através dela e deixar a membrana através de sua dissolução na fase aquosa do outro lado da bicamada. A Figura 15 descreve o modelo, esquematicamente.

Para simplificar, as propriedades da região hidrofóbica são aproximadas àquelas de líquidos do tipo óleo, como octanol ou um hidrocarboneto de cadeia longa. Tais propriedades incluem uma constante dielétrica similar ao de hidrocarboneto, que é assumida a ser constante por toda a parte hidrofóbica da bicamada. Além disso, assume-se que estrutura da bicamada é estática e possui bordas bem definidas, de forma que a mudança de um ambiente hidrofílico para um hidrofóbico deve ocorrer abruptamente. A difusão através da região hidrofóbica é a etapa lenta do processo.

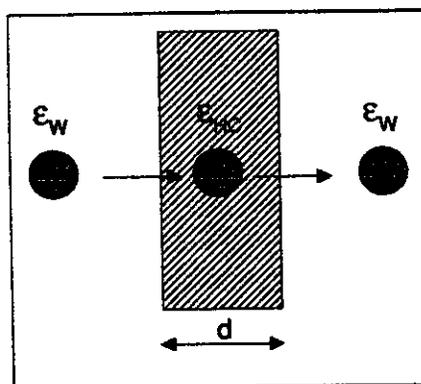


Figura 15 – Permeabilidade para um soluto pelo modelo de solubilidade-difusão [Paula and Deamer (1999)].

³ Adaptado de [Paula et al. (1996)], [Paula and Deamer (1999)].

No caso mais simples, o coeficiente de permeabilidade para uma partícula que atravessa a bicamada (d) pode ser expressa como:

$$P = \frac{KD}{d} \quad (1)$$

onde K é o coeficiente de partição da espécie permeante entre a água e um hidrocarboneto líquido correspondente ao interior hidrofóbico da membrana e D representa o coeficiente de difusão desta espécie dentro da membrana. Devido à solubilidade extremamente baixa de muitos íons e moléculas polares em solventes hidrocarbonetos, D é desconhecido em muitos casos, com exceção da água. Como observado por Finkelstein, o coeficiente de difusão da espécie permeante em água pode servir de aproximação razoável para D [Finkelstein (1987)]. A espessura da bicamada é dada por d , que é igual à espessura da região hidrofóbica.

O parâmetro crítico na Equação 1 é o coeficiente de partição, relacionado à constante de equilíbrio K , que pode ser calculado através da energia livre de Gibbs (ΔG) necessária para transferir uma partícula de uma fase aquosa para uma hidrofóbica:

$$K = \exp \left[\frac{(-\Delta G)}{RT} \right] \quad (2)$$

A energia livre total ΔG pode ser decomposta em cinco contribuições, incluindo termos eletrostático, hidrofóbico e de interação específica:

$$\Delta G = \Delta G_B + \Delta G_I + \Delta G_D + \Delta G_H + \Delta G_{SP} \quad (3)$$

Os três primeiros termos da Equação 3 são de natureza eletrostática: ΔG_B representa a energia de Born de transferência de um íon ou dipolo da água para um ambiente hidrofóbico com baixa constante dielétrica, tal como o interior de uma bicamada.

O segundo termo, ΔG_I , conhecido como energia de imagem, considera que a membrana é uma fina matéria hidrofóbica cercada por um ambiente aquoso. Embora o valor numérico de ΔG_I seja apenas uma pequena fração de ΔG_B , sua contribuição para a energia livre total aumenta com a redução da espessura da bicamada e pode ter um efeito notável no coeficiente de permeabilidade.

Como muitas bicamadas possuem um potencial de dipolo interno que favorece a partição de ânions sobre cátions na bicamada, seu efeito é incluído pela adição de ΔG_D . A origem do potencial de dipolo é relacionada a moléculas com dipolo orientado na

interface da bicamada, sendo a maioria provavelmente grupos de cabeças polares ou moléculas de água fortemente ligadas.

O termo hidrofóbico ΔG_H considera a energia necessária para transferir uma cavidade não-carregada com o tamanho de um átomo ou molécula de soluto individual da água para a bicamada. ΔG_H é sempre negativa e linearmente proporcional à área da superfície do soluto. Dependendo do tamanho do soluto, ΔG_H pode contribuir consideravelmente para ΔG , podendo cancelar a parcela de ΔG_B no caso de moléculas grandes.

Finalmente, se a molécula de soluto sofrer interações específicas tanto com a água quanto com o interior da bicamada, as contribuições de energia correspondente são conhecidas em termos de ΔG_{sp} . Exemplos de interação específica são ligações de hidrogênio entre moléculas de soluto e água.

Em suma, os coeficientes de permeabilidade previstos pelo modelo de solubilidade-difusão possuem apenas uma moderada dependência à espessura da membrana (d). Para solutos não-carregados sem um momento dipolo significativo, o gráfico semi-logaritmo de P contra d idealmente deve ser uma linha reta, pois, neste caso, D e K não dependem de d . Somente no caso de íons pequenos e dipolos grandes em bicamadas muito finas, K será afetado pela espessura da bicamada e é esperado um pequeno desvio da linearidade. No entanto, a influência total de d em P permanece pequena [Paula et al. (1996)].

VII.2.2. Modelo de poros transitentes

Embora o modelo de solubilidade-difusão seja satisfatório para a maioria de permeantes, existem alguns solutos para os quais tal teoria falha. Isto acontece em bicamadas muito finas e onde o permeante é um íon carregado positivamente (como o potássio), em lipossomas preparados com dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC). Neste caso, os coeficientes de permeabilidade são maiores que os previstos pelo modelo [Paula and Deamer (1999)].

Para minimizar esta discrepância, foi sugerido como caminho alternativo a existência de poros transitentes hidratados em bicamadas produzidos por flutuações térmicas (Figura 16). Passando pelos poros, o permeante pode evitar a barreira de energia de Born associada com o modelo de solubilidade-difusão. Além disso, os prótons podem ser deslocalizados pelos agregados ("clusters") de água ("water wires") existentes nos

defeitos que atravessam a membrana. Como este processo é muito mais rápido que a difusão, o modelo de poros transientes pode ser usado para explicar a alta permeabilidade observada para prótons [Paula et al. (1996)].

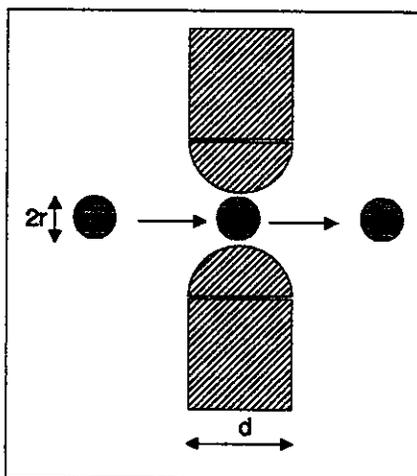


Figura 16 – Permeabilidade através de poros transientes hidratados [Paula and Deamer (1999)].

Parsegian mostrou que a energia de um íon localizado em um poro aquoso é significativamente menor do que a energia do mesmo íon em uma parte hidrofóbica da bicamada [Parsegian (1969)]. Como resultado, a velocidade de permeabilidade é maior. A questão é se existe um número suficiente de poros presentes na bicamada tal que a velocidade de penetração dos íons pelos poros possa exceder à velocidade de íons pelo método de solubilidade e difusão. Intuitivamente, o método de poros transientes torna-se uma alternativa atraente conforme a bicamada tende a ficar instável com a diminuição de sua espessura [Paula and Deamer (1999)].

O modelo de poros transientes assume que os permeantes passam por poros transientes e hidratados, formados por flutuações térmicas na bicamada. Poros hidrofílicos são considerados ao invés de poros hidrofóbicos, dado que sua formação é energeticamente mais favorável e, portanto, mais provável. A velocidade com a qual os permeantes atravessam a bicamada é relacionada à probabilidade de poros de tamanhos e profundidades suficientes surgirem na bicamada. A probabilidade de formação de um poro pode, então, ser descrita como uma função exponencial de energia necessária para formar um poro de uma dada área e profundidade:

$$P = \frac{(D_M \sigma n_o RT)}{(R_v A k_1)} \left[\pi r^2 + \frac{RT}{k_1} \right] \exp \left[\frac{(-k_1 \pi r^2)}{RT} \right] \exp \left[\frac{(-k_2 d)}{RT} \right] \quad (4)$$

onde os parâmetros k_1 e k_2 são as energias necessárias para criar um poro de área e profundidade unitárias na bicamada. Eles são determinados pelo ajuste de dados experimentais à Equação 4 que pode, então, ser usada para comparar coeficientes de permeabilidade teóricos com os medidos, como uma função de parâmetros, como espessura da bicamada e tamanho do soluto [Paula and Deamer (1999)].

VII.2.3. Modelo de "cluster-contact" ⁴

A teoria "cluster-contact" para a permeabilidade a prótons é baseada nas seguintes hipóteses:

1. A água, em meio com baixa constante dielétrica (como de bicamadas lipídicas), forma pequenos agregados ("clusters") devido à ligação de hidrogênio, acima da temperatura de transição de fase (T_m).
2. Os agregados podem ser protonados ou desprotonados e estabilizados pela ressonância de carga (Figura 17).
3. O contato entre um agregado carregado em uma monocamada com outro agregado com carga oposta de outra monocamada estabelece a transferência de próton através da bicamada lipídica.

Apesar da baixa solubilidade da água em óleo, as moléculas de água em bicamadas lipídicas constituídas por lipídios saturados acima da T_m são capazes de formar agregados. Isso ocorre devido a uma compensação de energia entre a entalpia da ligação de hidrogênio e a entropia de difusão de moléculas individuais. Cálculos preliminares sugerem que existem cerca de 3 a 4 moléculas de água por agregado. O mínimo de energia é obtido quando os agregados estão posicionados ao longo das cadeias acilas dos lipídios. Agregados lineares causam menor perturbação nos movimentos laterais das cadeias acilas e nas conformações.

Sabe-se que cargas em um meio com baixa constante dielétrica são mais estáveis se forem distribuídas por ressonância. Portanto, um agregado protonado de moléculas de água é mais estável se a carga positiva deslocalizar através dos vários átomos de oxigênios do agregado (Figura 18). Da mesma forma, um agregado desprotonado pode ser estabilizado por ressonância. Cada monocamada contém uma razão entre agregados de água carregados positiva e negativamente, refletindo o pH da água que

⁴ Adaptado de [Haines (2001)].

envolve a monocamada (Figura 18).

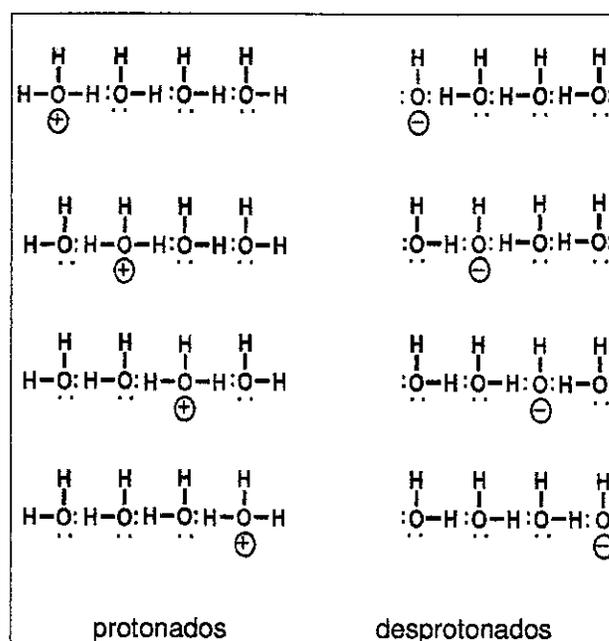


Figura 17 – Ilustração de agregados protonados (esquerda) ou desprotonados (direita) de moléculas de água. A ressonância dispersa as cargas, estabilizando o complexo em meio de baixa constante dielétrica [Haines (2001)].

Em meio com baixa constante dielétrica, os campos entre os agregados carregados estariam a uma distância considerável (Figura 18). Além disso, a força de atração entre eles resultaria em colisão e, conseqüentemente, na transferência de próton de uma espécie positiva (protonada) para uma negativa (desprotonada) (Figura 18(c)). A cinética de reação é favorecida pela força de atração entre dois íons. A termodinâmica do processo é favorecida pelo desaparecimento da carga em meio com baixa constante dielétrica. Quando tais colisões ocorrem entre dois agregados carregados que estão do mesmo lado da bicamada, não se observa um efeito considerável. Todavia, quando tais colisões ocorrem entre um agregado protonado em uma monocamada com um agregado desprotonado da monocamada oposta, existe a transferência de próton de um lado da membrana para o outro e, portanto, ocorre a migração de próton.

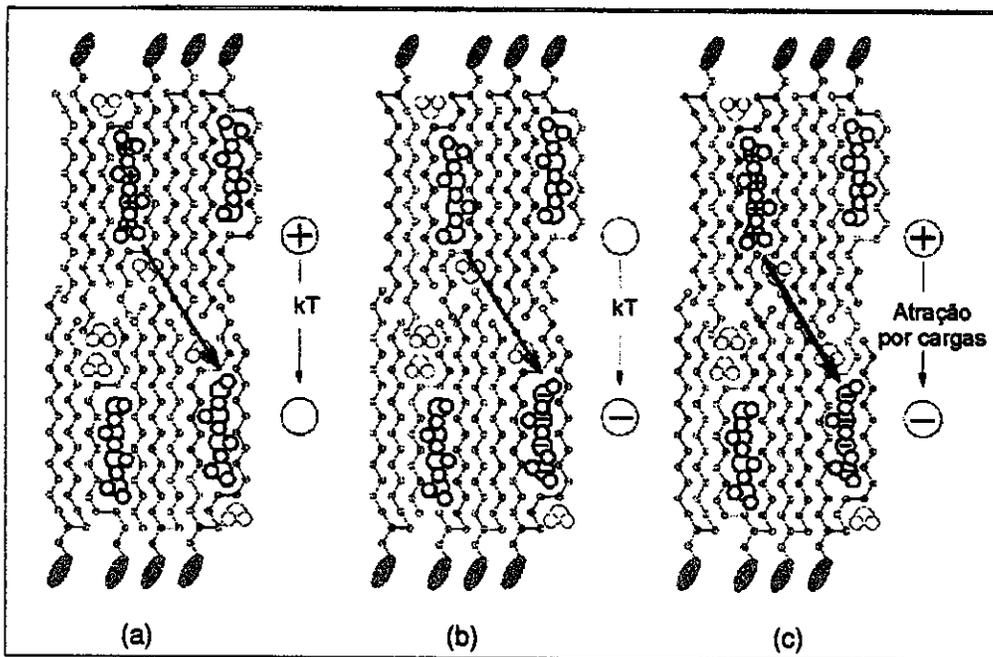


Figura 18 – Três modelos para a migração transmembrânica de prótons. Nos dois primeiros diagramas, o próton move-se de uma monocamada para outra por movimento cinético (kT). No terceiro diagrama, o agregado protonado (positivo) é atraído pelo agregado desprotonado (negativo) através do centro da bicamada [Haines (2001)].

VII.3. Discussão

VII.3.1. Comparação entre os modelos de migração de solutos em bicamadas lipídicas

Evidências experimentais de que íons e solutos não-eletrólitos migram através de bicamadas lipídicas com velocidades relevantes biologicamente foram obtidas por muitos pesquisadores [Papahadjopoulos (1971)], [Deamer and Nichols (1989)], [Paula et al. (1996)], [Haines (2001)]. A partir delas, foram propostos dois modelos moleculares para a migração de permeantes: o modelo de solubilidade-difusão e o modelo de poros transientes, discutidos nas seções VII.2.1 e VII.2.2.

Paula e colaboradores observaram o comportamento dos coeficientes de permeabilidade para água, uréia e glicerol em função da espessura da bicamada lipídica, relacionada com o número de carbonos presentes na cadeia acila (Figura 19) [Paula et

al. (1996)].

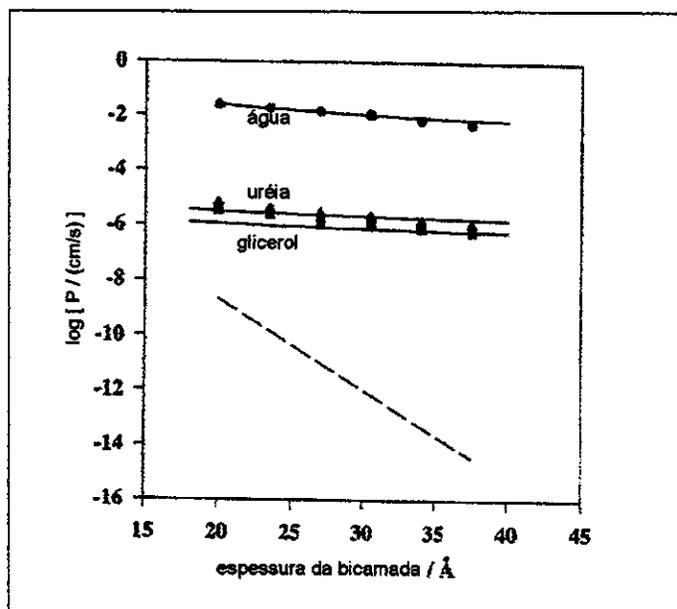


Figura 19 – Dependência da permeabilidade (P) para água, uréia e glicerol com a espessura da bicamada (d). As linhas sólidas representam os valores calculados pelo modelo de solubilidade-difusão e a linha tracejada representa os valores calculados pelo modelo de poros transientes [Paula et al. (1996)].

Para tais substâncias, a dependência moderada de P com d é consistente com o modelo de solubilidade-difusão. Embora ligeiramente menor que os dados experimentais, os coeficientes de permeabilidade calculados possuem a mesma ordem de grandeza. Além disso, as inclinações dos gráficos de P calculado em função de d são similares às inclinações experimentais, apesar de que, para uréia e glicerol, elas são menores. Cálculos análogos para solutos não-eletrólitos baseados no modelo de poros transientes mostraram duas incoerências. Em primeiro lugar, as permeabilidades calculadas eram muito pequenas por várias ordens de grandeza. Em segundo lugar, a dependência de P na espessura da bicamada não é adequadamente descrita. Tais fatores sugerem que a permeabilidade para moléculas polares neutras é mais adequadamente descrita pelo modelo de solubilidade-difusão do que pela de formação de poros [Paula et al. (1996)].

Para solutos iônicos, os coeficientes de permeabilidade são muito menores que os para pequenos solutos neutros. Uma barreira de permeabilidade maior origina-se principalmente da energia de Born, que é maior e positiva, e causa menor solubilidade dos íons no interior da bicamada. Em contraste, a contribuição da energia de Born para

não-eletrólitos somente é importante se a molécula é relativamente pequena e possui um momento de dipolo significativo [Paula and Deamer (1999)].

Para o cálculo de coeficientes de permeabilidade segundo a teoria de solubilidade-difusão, é imprescindível considerar o raio do íon hidratado, dado que o uso de raio do íon não-hidratado produz valores de coeficientes muito menores do que os obtidos experimentalmente [Paula and Deamer (1999)].

O modelo de solubilidade-difusão pode ser muito bem aplicado a ânions de haletos e também para cátions, se a bicamada for espessa (Figura 20). Entretanto, para cátions em bicamadas muito finas, o modelo mais adequado é o de poros transientes [Paula and Deamer (1999)]. Este fato sugere que a permeabilidade através de poros transientes hidratados em finas bicamadas é preferencial para cátions. Em bicamadas muito finas, a permeabilidade via processos de solubilidade-difusão é desprezível para a migração total de íons, embora seja relevante conforme a espessura da bicamada aumenta [Paula and Deamer (1999)].

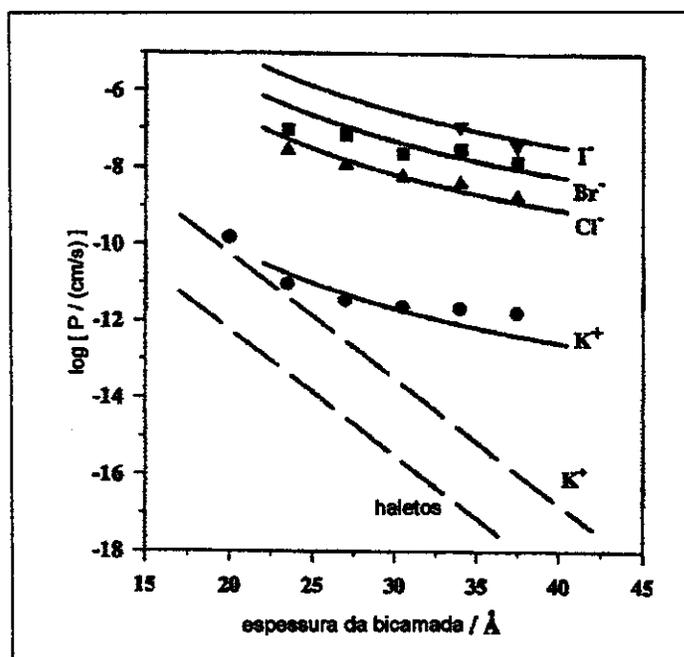


Figura 20 – Coeficientes de permeabilidade para íons potássio e haletos. As linhas sólidas representam os valores calculados pelo modelo de solubilidade-difusão, as linhas tracejadas representam os valores calculados pelo modelo de poros transientes e os pontos correspondem a dados experimentais [Paula et al. (1996)].

Em conclusão, o modelo de poros transientes parece ser dominante para íons, mas somente se a membrana for suficientemente fina. A permeação de íons pelo processo de

solubilidade-difusão torna-se mais significativa conforme a espessura da bicamada aumenta, devido à diminuição da presença de poros produzidos por flutuações térmicas com o aumento da estabilidade. Por outro lado, devido à alta solubilidade em fase hidrofóbica, a permeação de moléculas neutras é regida exclusivamente pelo modelo de solubilidade-difusão, independente da espessura da bicamada [Paula et al. (1996)].

Uma das observações experimentais mais interessantes é o valor do coeficiente de permeabilidade a prótons, que excede em muitas ordens de grandeza o valor para outros cátions monovalentes. *Mas por que isso ocorre?* Para responder esta questão, é necessário avaliar como os modelos podem ser aplicados para o caso dos prótons.

Em ambos os modelos de solubilidade-difusão e de poros transientes, como são considerados os raios dos íons hidratados, as espécies H_3O^+ e $H_9O_4^+$ são mais adequadas para representar os prótons. Paula e colaboradores realizaram um experimento com lipossomas constituídos por PC com cadeias acilas de diferentes comprimentos [Paula et al. (1996)]. Eles observaram que o modelo de poros transientes produziu um bom ajuste com os dados experimentais para lipídios com cadeias acilas curtas e intermediárias, considerando a espécie H_3O^+ . O ajuste foi menos satisfatório para lipídios de cadeia longa, onde o modelo de solubilidade-difusão produziu resultados aceitáveis, mas somente para a espécie $H_9O_4^+$. No entanto, utilizar ambas as espécies é uma escolha arbitrária sem suporte experimental. Portanto, outro modelo poderia ser criado para explicar a migração de prótons através de bicamadas lipídicas [Paula and Deamer (1999)].

Uma possível hipótese é que defeitos transientes (poros) ocorrem em todas as bicamadas lipídicas, onde o número relativo de poros depende da espessura da bicamada [Paula and Deamer (1999)]. Como discutido anteriormente, bicamadas muito finas possuem um grande número destes defeitos, os quais são a rota predominante para íons como o potássio. Provavelmente, estes defeitos coexistam durante um intervalo de tempo, sendo que alguns possuem um curto tempo de vida, durante o qual os íons potássio não têm tempo suficiente para atravessar a bicamada. No entanto, os prótons podem atravessar a membrana por um modelo especial, não disponível para outros cátions, que envolve sua deslocalização ao longo de agregados de água, unidos por ligação de hidrogênio [Paula and Deamer (1999)]. Em 1980, Nichols e Deamer postularam que os prótons deveriam movimentar-se ao longo de agregados de água contidos em defeitos com curto tempo de vida que atravessam a membrana. Desta forma, um próton poderia percorrer por estes defeitos com curto tempo de vida, que não

podem, em tempo hábil, acomodar outros íons inorgânicos monovalentes [Nichols and Deamer (1980)].

Baseado nestes fatos e hipóteses, Haines publicou recentemente sua hipótese para explicar a migração de prótons em bicamadas lipídicas, sem contudo validar seu modelo com dados experimentais [Haines (2001)]. Seu modelo é conhecido como modelo de "cluster-contact", que assume a formação de agregados protonados e desprotonados de água no interior da bicamada lipídica e a transferência de próton de um lado da membrana para o outro, através da colisão que ocorre entre um agregado protonado em uma monocamada com um agregado desprotonado da monocamada oposta [Haines (2001)]. Este modelo ainda não foi validado e o autor sugere vários experimentos para testá-lo. Haines acredita que três tipos de experimentos poderiam evidenciar a inibição do movimento de prótons pelo centro da bicamada (Figura 21).

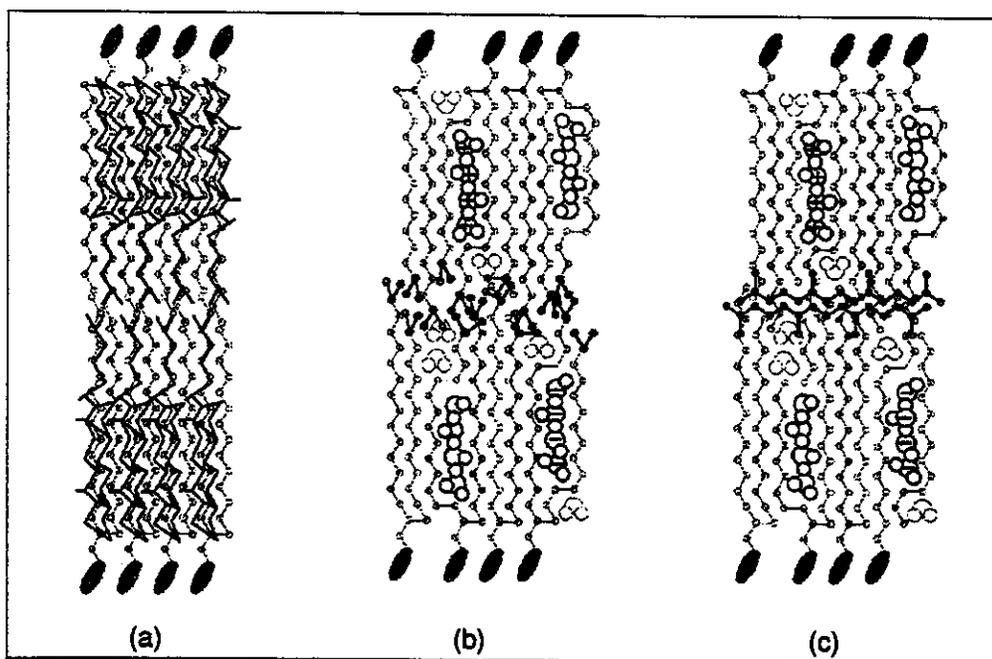


Figura 21 – Três modelos possíveis que explicam a hipótese de "cluster-contact". O modelo assume que colisões de agregados na bicamada podem ser inibidas pela presença de hidrocarbonetos no centro da bicamada. Existem três formas de evitar as colisões: (a) inibição de formação de agregados, evitando a entrada de água (esterol, hopanóide ou tetraimanol); (b) ramificações dos terminais das cadeias acila de lipídios (iso-/anteiso-lipídios); e (c) presença de hidrocarbonetos no centro da bicamada (isoprenos: esqualeno, dolicol, ubiquinona) [Haines (2001)].

O primeiro experimento baseia-se na redução da quantidade de água que forma agregados. Segundo Finkelstein, esteróides inibem a transferência de água através de bicamadas que contêm estas substâncias [Finkelstein (1987)]. Portanto, lipídios esteróides como fitosterol, tetraimanol ou hopanóides poderiam inibir a migração de prótons (Figura 21a).

Outra tentativa experimental é empacotar o centro da bicamada com moléculas de hidrocarbonetos. Isso poderia inibir a colisão entre agregados de cargas opostas ao longo da bicamada. Neste experimento, os hidrocarbonetos devem estar situados no centro da bicamada entre as duas monocamadas [Haines (2001)]. Para tanto, existem duas alternativas: (1) ramificar com grupos metila ou etila o final das cadeias acilas dos lipídios (Figura 21b), ou (2) obter um hidrocarboneto que se posicione seletivamente no plano de clivagem da bicamada (Figura 21c) [Haines (2001)]. Para a primeira alternativa, poder-se-iam usar os iso/anteiso-lipídios de bactérias Gram positivas. Estes lipídios possuem grupos metila na terminação da cadeia, que poderiam empacotar melhor a bicamada e evitar a colisão entre agregados. A segunda alternativa é dopar a bicamada com isoprenos. Devido a suas múltiplas ramificações, eles residiriam no centro da bicamada para não perturbar a cooperatividade entre as cadeias lipídicas de cada monocamada. O esqualeno é um exemplo.

VII.3.2. Como diminuir e/ou inibir a migração de prótons?

Colesterol

A partir da análise da composição lipídica de membranas celulares de organismos vivos, sabe-se que membranas plasmáticas de animais, ricas em colesterol, utilizam gradientes de Na^+ , e todos os outros organismos vivos, ricos em fitosterol, usam um gradiente de prótons [Haines (2001)]. Com isso, Haines sugeriu que o fitosterol pode inibir a migração de prótons, de forma análoga que o colesterol inibe a migração de Na^+ [Haines (2001)].

Apesar disso, o efeito de colesterol na permeação de água e próton é relevante. Deamer e Nichols [Deamer and Nichols (1989)] compararam a permeabilidade para água de vesículas de DMPC [Carruthers and Melchior (1983)] e para próton de vesículas de PC de ovo [Li et al. (1988)] em função da porcentagem molar de colesterol (Figura 22).

Ambas as permeabilidades para água e para próton foram reduzidas de forma similar, embora os resultados fossem obtidos com fosfolipídios possuindo diferentes

composições de cadeia acila. As restrições rotacionais em cadeias acilas, sugerem que o colesterol induz um empacotamento lateral dos fosfolípidios, bem como a si mesmo, haja visto que a área total ocupada pelo colesterol e fosfolípidios é menor do que a soma das áreas individuais ocupadas [Haines (2001)].

Deamer e Nichols também observaram que existe a evidência de que as permeabilidades para água e para próton estão correlacionadas sob certas condições [Deamer and Nichols (1989)]. Por exemplo, Elamrani e Blume compararam as permeabilidades para próton e para água de lipossomas acima e abaixo da T_m e observaram que os coeficientes de permeabilidade para ambos aumentaram duas ordens de grandeza em fase líquido-cristalina [Elamrani and Blume (1983)]. Ou seja, a permeabilidade a prótons é menor em temperaturas abaixo da T_m .

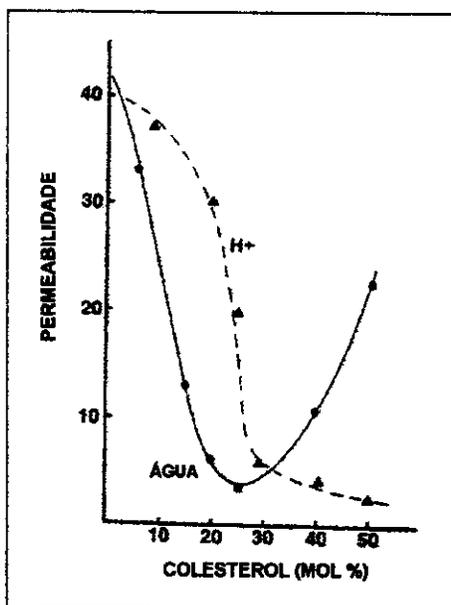


Figura 22 – Efeito da adição de colesterol na permeabilidade de lipossomas para água (●) e para prótons (▲). Os dados para água foram retirados de Carruthers e Melchior [Carruthers and Melchior (1983)] e para próton de Li *et al.* [Li *et al.* (1988)]. Os lípidios são DMPC (água) e PC de ovo (próton). A escala de permeabilidade para prótons é de 10^{-4} [Deamer and Nichols (1989)].

Experimentos de Haines

De acordo com o modelo de "cluster-contact" proposto por Haines, três tipos de experimentos poderiam mostrar a inibição do movimento de prótons pelo centro da

bicamada (Figura 21) [Haines (2001)]. O primeiro experimento baseia-se na diminuição da quantidade de água que forma agregados, através do uso de lipídios esteróis como fitosterol, tetraimanol ou hopanóides. Os outros experimentos estão baseados no impedimento de colisões entre agregados de água, a partir do uso de substâncias como lipídios com cadeias acilas ramificadas com grupos metila ou etila (como iso/anteiso-lipídios de bactérias Gram positivas) ou como moléculas de hidrocarbonetos (como isoprenos) [Haines (2001)].

Seres procariontes acidófilos e alcalifílicos precisam manter uma força-motriz de prótons para sintetizar ATP. Provavelmente, o bloqueio de migração de prótons é mantido pela presença dos iso/anteiso-lipídios em suas membranas plasmáticas [Haines (2001)], que possuem ramificações, como podem ser vistas na Figura 23a.

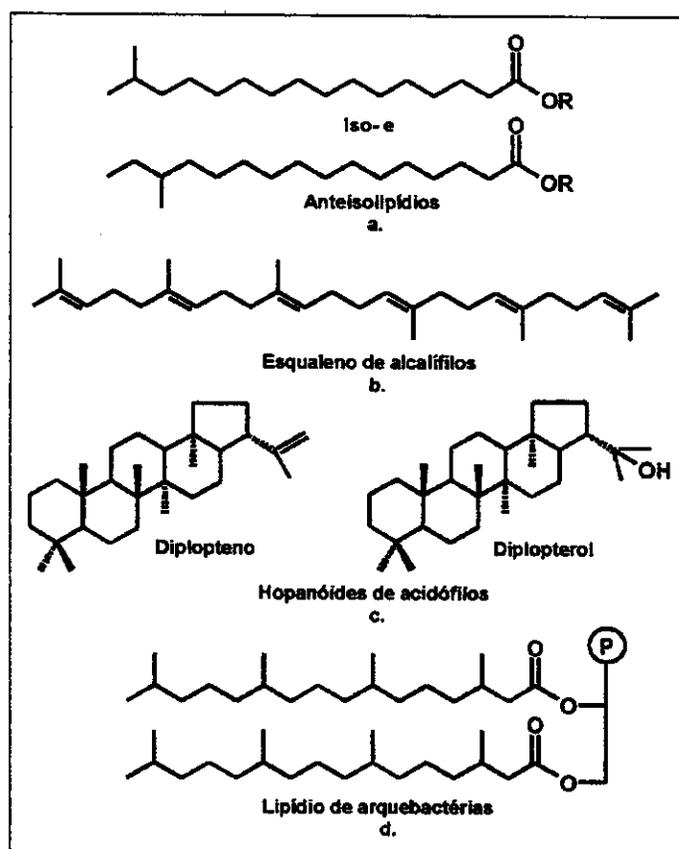


Figura 23 – Substâncias supostas de inibir a migração de prótons em bicamadas: (a) Iso-/anteiso-lipídios presentes em ambos organismos acidófilos e alcalifílicos; (b) Esqualeno presente em alcalifílicos; (c) Hopanóides presentes em acidófilos; (d) Fosfolipídios encontrados em bactérias [Haines (2001)].

Hopanóides e tetraimanol (Figura 23) são produzidos anaerobicamente a partir do esqualeno. Eles possuem vários anéis, como esteróis, que são posicionados próximos aos grupos de cabeça polar de uma monocamada [Haines (2001)]. São encontrados quase que exclusivamente em membranas que possuem grande gradiente de prótons. Níveis baixos de hopanóides são encontrados em bactérias acidófilas Gram positivas, que possuem iso/anteiso-lipídios (*B. acidocaldarius* e *B. acidoterrestis*). A evidência de que hopanóides podem inibir a migração de prótons surgiu após se observar um aumento da concentração de hopanóides na membrana destas bactérias quando submetidas a um pH menor e uma temperatura maior [Haines (2001)].

Esteróis com ramificações nas cadeias laterais, como o fitosterol, somente são encontrados nas membranas plasmáticas de organismos que usam gradiente de prótons [Haines (2001)]. Além de grupos metila ou etila localizados no carbono 24 (C24), tais esteróis geralmente têm uma insaturação do tipo trans no carbono 22 (C22) (Figura 24).

Em seus estudos sobre a estrutura cristalina do colesterol, Duax e colaboradores perceberam uma considerável flexibilidade conformacional na cadeia lateral [Duax et al. (1980)]. Conformações *Gauche*, que posicionam a terminação dimetila longe do centro da bicamada, foram encontradas para cada ligação, exceto para a ligação *exo* ao anel D (Figura 24). Em fitosterol, a dupla ligação trans em C22 aparentemente contrai a cauda, empurrando a ramificação de C24 e a terminação dimetila para o centro da bicamada [Haines (2001)]. De acordo com o modelo de "cluster-contact", os fitosteróis inibem a migração de prótons por dois modelos: (1) os anéis de esteróis que se situam perto dos grupos de cabeça polar impediriam a entrada de água na bicamada e, conseqüentemente, a formação de agregados; e (2) o empacotamento do centro da bicamada pelas ramificações inibiria mecanicamente o contato entre agregados [Haines (2001)].

Eucariontes possuem surpreendentemente altos níveis de isoprenos e suas membranas plasmáticas apresentam um gradiente de prótons. Os isoprenos predominantes nestes organismos são dolicol, ubiquinona e plastoquinona (Figura 25). Outros isoprenos como caroteno e luteína geralmente contribuem com 5% (mol/mol) para as bicamadas lipídicas. Medidas de RMN e espalhamento de nêutrons indicaram que o dolicol está localizado no centro de bicamadas de fosfolipídios sintéticos [Valtersson et al. (1985)]. Em lisossomas, nos quais o pH é muito baixo, a presença de isoprenos no centro da bicamada, separando as duas monocamadas, serviria para manter o gradiente de prótons nestas organelas [Haines (2001)].

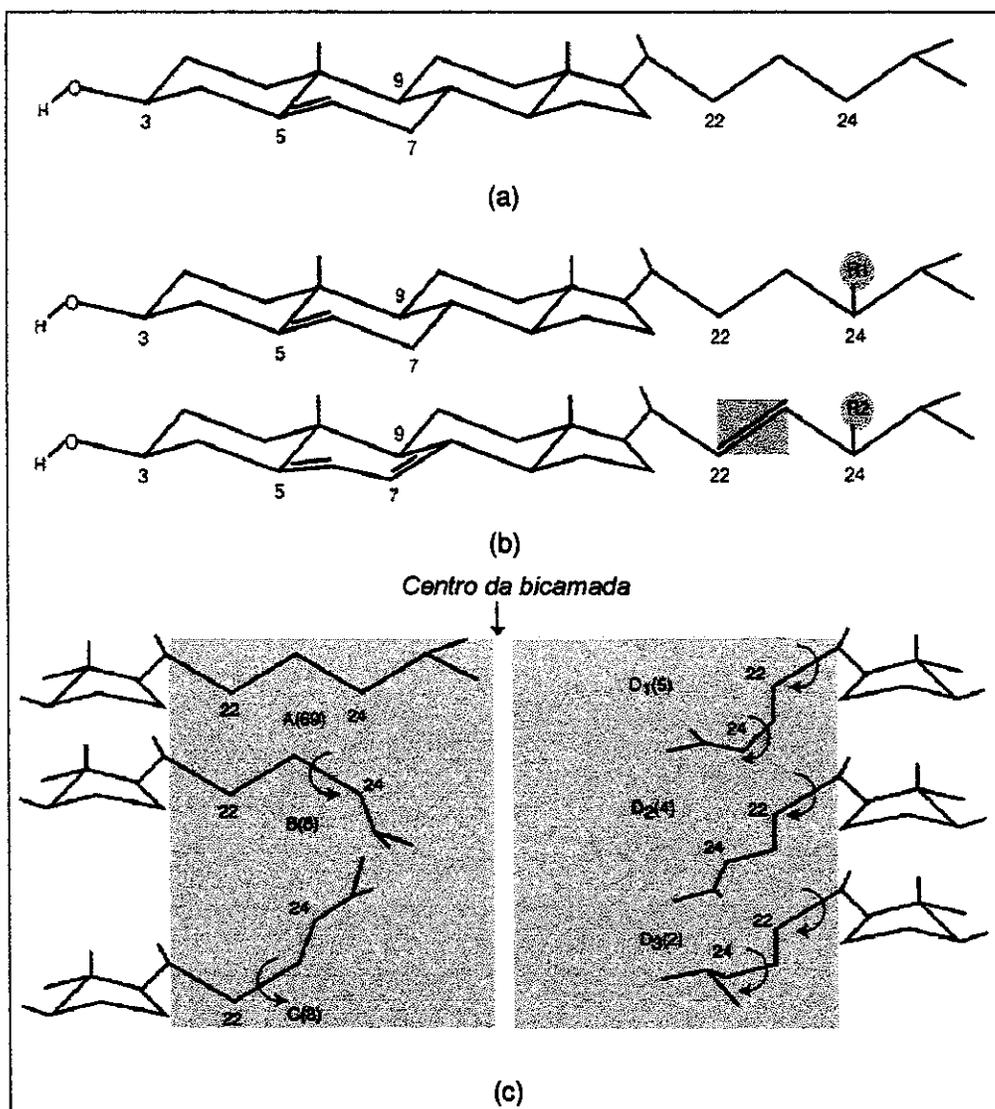


Figura 24 – (a) Estrutura de colesterol encontrada em membranas que possuem gradiente de Na^+ . (b) Alguns fitosteróis típicos presentes em membranas de organismos eucariontes que possuem gradiente de prótons. (c) Conformações da cadeia lateral de colesterol observadas em estruturas cristalinas. Os números entre parênteses indicam o número de cristais para cada conformêro. As setas representam conformações *Gauche* [Haines (2001)].

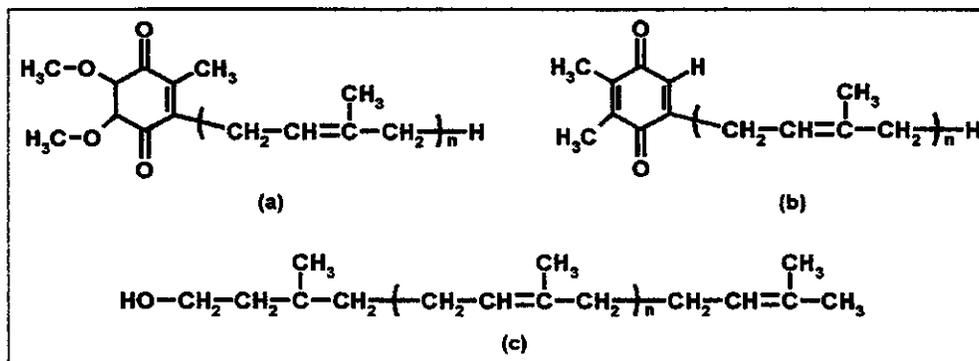


Figura 25 – Estruturas de alguns isoprenos: (a) ubiquinona; (b) plastoquinona; e (c) dolicol [Haines (2001)].

Sacarose, trealose e PEG

Outros compostos que podem diminuir a quantidade de água presente nas bicamadas lipídicas são a sacarose, a trealose e o PEG. Eles são capazes de desidratar a interface lipídica, induzindo um aumento do empacotamento das bicamadas e, conseqüentemente, diminuindo a permeabilidade da vesícula. De acordo com métodos calorimétricos e de difração de raios-X, cerca de 18 a 24 moléculas de água estão associadas às fosfatidilcolinas, dependendo se os lipídios são estabilizados como vesículas grandes ou pequenas, contribuindo para a espessura da bicamada e, portanto, para a barreira de permeabilidade [Luzardo et al. (2000)], [Diaz et al. (1999)]. Quando lipídios anidros são hidratados, as primeiras quatro ou cinco moléculas de água conferem mobilidade à cabeça polar, às partes glicerol e carbonila. Esta água está localizada ao redor de grupos fosfato, como observado por Hübner e Blume, a partir de medidas espectroscópicas na região do infravermelho [Hübner and Blume (1998)].

A polarização de moléculas de água na interface lipídica tem sido visualizada a partir de simulações de dinâmica molecular. Em um excesso de água, a primeira camada de moléculas de água, que interagem por ligação de hidrogênio com as cabeças polares da membrana, é polarizada, possuindo a segunda camada uma orientação não-preferencial. Tal água polarizada não é afetada pela neutralização de dipolos correspondentes aos grupos carbonila ou pela sacarose. Em contrapartida, a trealose decresce o potencial de dipolo, sendo uma conseqüência do deslocamento da água polarizada [Luzardo et al. (2000)].

Luzardo e colaboradores descreveram a estrutura de hidratação da interface da

bicamada lipídica, como sendo composta por três ou quatro moléculas que são deslocadas por sacarose ou trealose de forma coligativa e que não são polarizadas; sete moléculas de água fortemente ligadas às carbonilas que são deslocadas apenas por trealose e são polarizadas, principalmente nas carbonilas; sete moléculas de água muito fortemente ligadas aos fosfatos que podem ser substituídas por sacarose ou trealose se a desidratação for extremamente drástica, como no caso de liofilização [Luzardo et al. (2000)]. Assim, a sacarose é capaz de desidratar 4 moléculas de água da bicamada lipídica e a trealose, 11 moléculas. De acordo com os trabalhos destes autores, a trealose parece ser capaz de intercalar entre as cabeças polares dos fosfolipídios, como sugerido pela interação com as carbonilas. Resultados anteriores mostraram que a trealose pode agir como espaçador entre lipídios, aumentando a área por molécula. Os autores sugerem que algumas moléculas de água podem ser polarizadas na carbonila *sn-2* (Figura 26). Entretanto, deve ser considerado que a trealose pode intercalar no plano da membrana, ligando-se à carbonila *sn-1*. Johnston e colaboradores mostraram que monocamadas de fosfolipídios em fase aquosa são expandidas lateralmente quando trealose é adicionada à subfase [Johnston et al. (1984)].

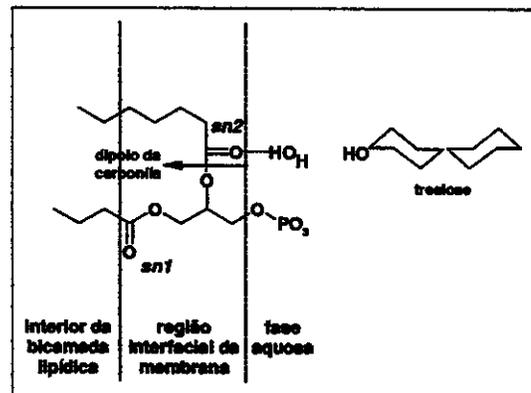


Figura 26 – Molécula de fosfatidilcolina e a orientação dos grupos carbonila *sn-1* e *sn-2*. A ligação de hidrogênio da carbonila *sn-2* com açúcar ou água está indicada [Diaz et al. (1999)].

A conformação de grupos fosfato é determinada pelas primeiras quatro ou cinco moléculas de água. Além disso observa-se que quando o quantidade de água na amostra é menor que 0,2 moles de água por mol de lipídio, a trealose é capaz de deslocar a frequência do estiramento anti-simétrico da ligação P=O para valores menores, sugerindo que este açúcar pode formar ligação de hidrogênio na ausência de

água. Em condições de extrema desidratação, a sacarose pode também interagir via ligação de hidrogênio com os fosfatos. Estes fatores podem ser a explicação do porquê ambos os açúcares são comparáveis em termos de eficiência no procedimento de liofilização [Luzardo et al. (2000)]. No entanto, Crowe e Crowe descobriram que trealose é muito mais eficiente que sacarose em preservar vesículas sonificadas, mas que ambos são similares para vesículas extrudadas [Crowe and Crowe (1988)].

Segundo resultados obtidos por FTIR, como sacarose não produz uma diminuição na frequência dos grupos carbonila de DMPC e não afeta o potencial de dipolo, as quatro moléculas de água deslocadas pelo açúcar não são polarizadas. A sacarose possui um efeito na frequência de vibração das carbonilas que é qualitativamente diferente do efeito da trealose e, além disso, é diferente para as duas populações. Pode-se supor que o grupo *sn*-1 não é acessível à sacarose, devido à sua localização na interface da bicamada (Figura 26). Portanto, nenhuma intercalação de sacarose e expansão de área deve ser esperada. A população de carbonilas *sn*-2 é deslocada a altas frequências, ou seja, o oposto ao que ocorreria com o aumento da hidratação. Portanto, a ação osmótica da sacarose promove a desidratação de uma parte da população de carbonilas, provavelmente as expostas à água na posição *sn*-2. O ligeiro aumento do potencial de dipolo sugere que o efeito da sacarose pode aumentar o empacotamento da região interfacial, aumentando, portanto, o número de dipolos por unidade de área [Luzardo et al. (2000)].

Os modelos de ação da trealose e da sacarose são totalmente diferentes, provavelmente devido à distribuição estereoquímica dos grupos OH destes açúcares nas posições equatorial e axial. No entanto, em condições drásticas, sob as quais a água é completamente retirada, ambos os açúcares podem possuir similares ações protetoras. Assim, pode-se inferir que o potencial de dipolo de uma membrana lipídica pode ser modulado conforme o deslocamento seletivo de moléculas de água por açúcares que possuam uma distribuição espacial específica de OH e que interajam com as carbonilas da interface lipídica [Luzardo et al. (2000)].

Como a sacarose, o PEG também possui uma característica de retirar água da interface lipídica. Arroyo e colaboradores verificaram que o PEG induz um aumento do empacotamento das bicamadas lipídicas quando homogeneamente distribuído dentro e fora da vesícula, devido à ação de desidratação da bicamada, provavelmente da região da cabeça polar [Arroyo et al. (1998)].

Com todas estas informações, é possível concluir que o primeiro experimento (CPT-

11:LUV) realizado conseguiu manter um gradiente transmembrânico de pH, devido à presença de sacarose e de PEG (proveniente de DSPE-PEG 2000). Devido à capacidade de desidratar a interface lipídica de vesículas, ambos os compostos possivelmente proporcionaram um maior empacotamento da bicamada, possibilitando, assim, a existência de um gradiente transmembrânico de pH a 19°C.

Cardiolipina e fosfatidilglicerol em mitocôndrias

Considerando sistemas que possuem um gradiente de prótons, a mitocôndria é uma organela que possui uma membrana interna capaz de evitar a migração de prótons [Stuart et al. (2001)], [Matsko et al. (2001)]. Entretanto, o modelo pelo qual este gradiente é mantido ainda não é bem compreendido. Stuart e colaboradores sugerem que os fosfolípidios e as proteínas existentes na membrana interna da mitocôndria são importantes no processo de transferência de prótons [Stuart et al. (2001)]. A cardiolipina (difosfatidilglicerol) é a espécie mais abundante encontrada na membrana interna desta organela.

Além de cardiolipina, a mitocôndria possui em sua membrana interna ceramida, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina e fosfatidilglicerol (PG), sendo este presente em quantidade considerável, por ser o precursor da biosíntese de cardiolipina. Segundo Matsko e colaboradores, a mitocôndria possui poros conhecidos como poros de transição de permeabilidade [Matsko et al. (2001)]. Estes pesquisadores realizaram um estudo de apoptose de mitocôndrias e descobriram que, durante este processo, estes poros abrem-se conforme ocorre a perda de cardiolipina e, principalmente, de grande quantidade de PG, bem como o aumento da concentração de ceramida na membrana mitocondrial. Desta forma, pode-se supor que PG e cardiolipina estejam relacionadas com o mecanismo de abertura dos poros da bicamada lipídica de mitocôndrias e, conseqüentemente, com o mecanismo de manutenção de um gradiente de prótons.

Lipídios de mielina

Em contraste com a maioria dos substratos lipídicos, em 1994, Díaz e Monreal mostraram que lipossomas preparados com lipídios extraídos de mielina exibem uma desprezível permeabilidade a prótons, como determinada pelas mudanças na fluorescência da sonda 9-aminoacridina [Díaz and Monreal (1994)].

A sonda fluorescente 9-aminoacridina (9AA) é um indicador fluorescente de pH, que sofre supressão de fluorescência quando presente em meio ácido, devido à sua

protonação ($pK_a=4,53$). Desta forma, esta sonda foi utilizada para monitorar a acidificação do cerne aquoso dos lipossomas (Figura 27). Lipossomas LUVs preparados em 200mM de KCl, pH 7,75, foram diluídos 100 vezes em um meio de pH idêntico, mas contendo 200mM de cloreto de colina, ao invés de KCl, e 6 μ M de 9AA, que facilmente é incorporada pelas vesículas. Em seguida, foi adicionado 1 μ M de valinomicina, que favorece a difusão de íons potássio (K^+) através da membrana para meios pobres neste íon, para o estabelecimento de um equilíbrio de K^+ , gerando um potencial de membrana ($\Delta\Psi$). Neste caso, houve a geração de potencial de difusão de potássio de -118 mV (negativo no interior da vesícula). A valinomicina somente resultou em um pequeno decréscimo da fluorescência da sonda, como pode ser visto na Figura 27.

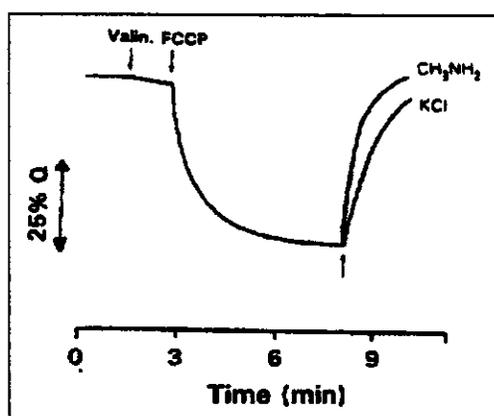


Figura 27 – Fluxo de prótons em bicamadas lipídicas de lipossomas preparados a partir de lipídios de mielina, usando a sonda fluorescente 9AA ($Q=I/I_0$; Time=tempo) [Díaz and Monreal (1994)].

Após a geração deste potencial, na ausência de outros contra-íons permeantes à membrana, os prótons entram no espaço intravesicular, se houver caminhos (ou poros) na membrana, por onde os prótons possam migrar. Estes caminhos são favorecidos pela adição do ionóforo⁵ de prótons carbonil-cianeto *p*-trifluorometóxiifenilhidrazona, conhecido por FCCP (4 μ M), que induz a permeação de prótons em lipossomas. A adição de FCCP causou uma rápida supressão de fluorescência da sonda, indicando uma abrupta acidificação do compartimento interno dos lipossomas. A fluorescência original foi rapidamente restabelecida com a adição de metilamina a 10mM, que colapsa o gradiente de pH, ou com KCl 5mM, que modifica o equilíbrio entre K^+ e H^+ .

⁵ Ionóforo: é um composto que facilita a transmissão de um íon através da bicamada lipídica, pela combinação com o íon ou pelo aumento da permeabilidade da bicamada lipídica.

Outros experimentos foram realizados com o intuito de testar a permeabilidade a prótons em resposta ao estabelecimento de um gradiente de pH entre os meios intra- e extraventricular (permeabilidade não-ohmica a prótons), monitorando a fluorescência de 9AA, como mostra a Figura 28.

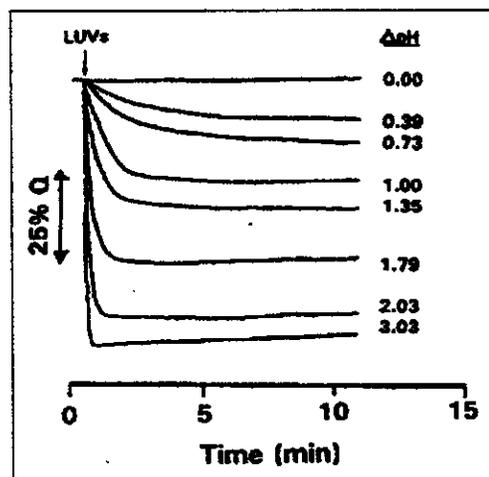


Figura 28 – Monitoramento da permeabilidade a prótons de lipossomas LUV preparados com lipídios de mielina em diferentes ΔpH , a partir da sonda fluorescente 9AA ($Q=I/I_0$; Time=tempo) [Díaz and Monreal (1994)].

Uma alíquota de LUVs preparado em tampão HEPES a 10mM, MES a 10mM, contendo cloreto de colina a 12mM, pH 5,72, foi adicionada a uma cubeta de quartzo que continha 2mL do mesmo tampão com pH variando de 5,72 a 8,74 (ΔpH , 0–3,03), e 6 μ M de 9AA (Figura 28). Isso resultou em uma rápida supressão da fluorescência inicial, cuja magnitude foi dependente do ΔpH imposto. A partir da Figura 28, pode-se observar que quanto maior o ΔpH imposto, mais rápida é a migração de 9AA para o interior da vesícula. Após a supressão inicial, uma estável linha de base foi obtida, mesmo para o maior valor de ΔpH . Este fato indica que o gradiente de pH (ΔpH) permanece estável, ou seja, que não existe efluxo substancial de prótons do meio intravesicular (ácido) para o meio externo.

Os autores observaram que o diâmetro das vesículas aparenta ser crítico na manutenção de gradientes de pH, já que vesículas SUV apresentaram permeabilidade a prótons muito maior que vesículas LUV e MLV.

Os autores acreditam que esta inesperada baixa permeabilidade a prótons seja devida à composição lipídica da mielina, que possui altas quantidades de colesterol e

esfingolípídios e baixos níveis de ácidos graxos. Também podem contribuir para a baixa permeabilidade a prótons outros fatores pertinentes à composição da mielina, como a ausência de proteolípídios, a presença de quantidades elevadas de cerebrosídeos e pequenas de glicoesfingolípídios (como gangliosídeos), e a espessura incomum das bicamadas lipídicas de mielina, devido à presença de quantidades substanciais de esfingolípídios com longas cadeias acilas. A peculiar e característica composição lipídica da matriz de mielina aparenta ser responsável pela baixa permeabilidade dos lipossomas a prótons, um fato que sugere que, em mielinas, somente as proteínas são capazes de transportar prótons através da membrana, como foi comprovado no trabalho destes mesmos autores [Díaz et al. (1996)].

A análise qualitativa da composição lipídica da matriz de mielina indicou a presença das seguintes substâncias: esfingomiéline, PC, PS, PI, cardiolípine, PA, PE, cerebrosídeos, cerebrosídeos ligados a ácidos graxos, monooleína, colesterol. Na verdade, neste trabalho não foi possível identificar qual ou quais lipídios são responsáveis pela baixa permeabilidade a prótons de lipossomas preparados com extrato lipídico de mielina. Na realidade, a combinação de todos os lipídios presentes na mielina pode ser responsável por esta característica.

É importante ressaltar que o trabalho de Díaz e Monreal [Díaz and Monreal (1994)] é o único da literatura a demonstrar a preparação de lipossomas que conseguem manter um gradiente transmembrânico de prótons.

Considerações finais

Nesta seção, vimos que o uso de substâncias como esteróis (colesterol, ergosterol, hopanóides), lipídios com cadeias acilas ramificadas, isoprenos (caroteno, dolicol, ubiquinona), açúcares como sacarose e trealose, PEG, cardiolípine e fosfatidilglicerol, bem como o uso de temperaturas menores que a T_m , podem favorecer a manutenção de um gradiente de prótons por longo intervalo de tempo em bicamadas lipídicas de membranas celulares e de lipossomas. Apesar deste rol de substâncias, não há trabalhos na literatura que comprovem que eles possam manter um gradiente de prótons, sendo mera especulação. Somente existe o trabalho de Díaz e Monreal [Díaz and Monreal (1994)], que utiliza lipídios de mielina na preparação de lipossomas que conseguem manter um gradiente transmembrânico de prótons, embora os autores desconheçam qual ou quais lipídios são responsáveis pela baixa permeabilidade a prótons.

O trabalho de Díaz e Monreal foi realizado considerando experimentos bem elaborados e criteriosos, e, pela sua relevância, deve ser usado como artigo de referência para o nosso trabalho.

O próximo capítulo mostra a aplicação de alguns destes compostos na nossa formulação lipossomal e quais suas conseqüências.

Capítulo VIII

Lipossomas e gradiente transmembrânico de pH: sucesso experimental

O grande desafio em nosso trabalho é como manter o composto CPT-11 na forma lactona em lipossomas estericamente estabilizados a 37°C, a partir da permanência de um gradiente transmembrânico de pH em um longo intervalo de tempo.

Existem trabalhos na literatura [Sadzuka et al. (1997)], [Colbern et al. (1998)], [Working et al. (1999)] sugerindo que a encapsulação de Camptotecina e seus derivados, como CPT-11, em lipossomas estericamente estabilizados, pode evitar a ocorrência de hidrólise do anel de lactona. Os trabalhos de Burke [Burke and Gao (1994)] e Sadzuka [Sadzuka et al. (1997)] são muito relevantes para o estudo destes fármacos em lipossomas, mas seus procedimentos de quantificação da forma lactona não são confiáveis, pois envolvem a suspensão dos lipossomas em meio ácido, favorecendo o deslocamento do equilíbrio para a forma lactona.

A não ocorrência de hidrólise foi comprovada neste trabalho através do estudo da cinética de hidrólise de CPT-11 encapsulado em lipossomas estericamente estabilizados, constituídos por DSPC, DSPE-PEG 2000 e colesterol, a 19°C. Infelizmente a 37°C a velocidade de hidrólise é muito grande. Segundo dados sobre medidas de grau de anisotropia, sabe-se que a hidrólise do anel de lactona em lipossomas ocorre a 37°C devido à migração de prótons do cerne aquoso para a solução externa, não sendo possível manter um gradiente transmembrânico de pH.

Muitos experimentos foram realizados com o intuito de obter uma formulação que mantivesse este gradiente, mas nenhum experimento obteve o mesmo sucesso que a primeira formulação.

No capítulo anterior (VII), vimos que o uso de substâncias como esteróis (colesterol, ergosterol, hopenóides), lipídios com cadeias acilas ramificadas, isoprenos (caroteno, dolicol, ubiquinona), açúcares como sacarose e trealose, PEG, cardiolipina e fosfatidilglicerol, bem como o uso de temperaturas menores que T_m , podem favorecer a manutenção de um gradiente de prótons por longo intervalo de tempo em bicamadas lipídicas de membranas celulares e de lipossomas.

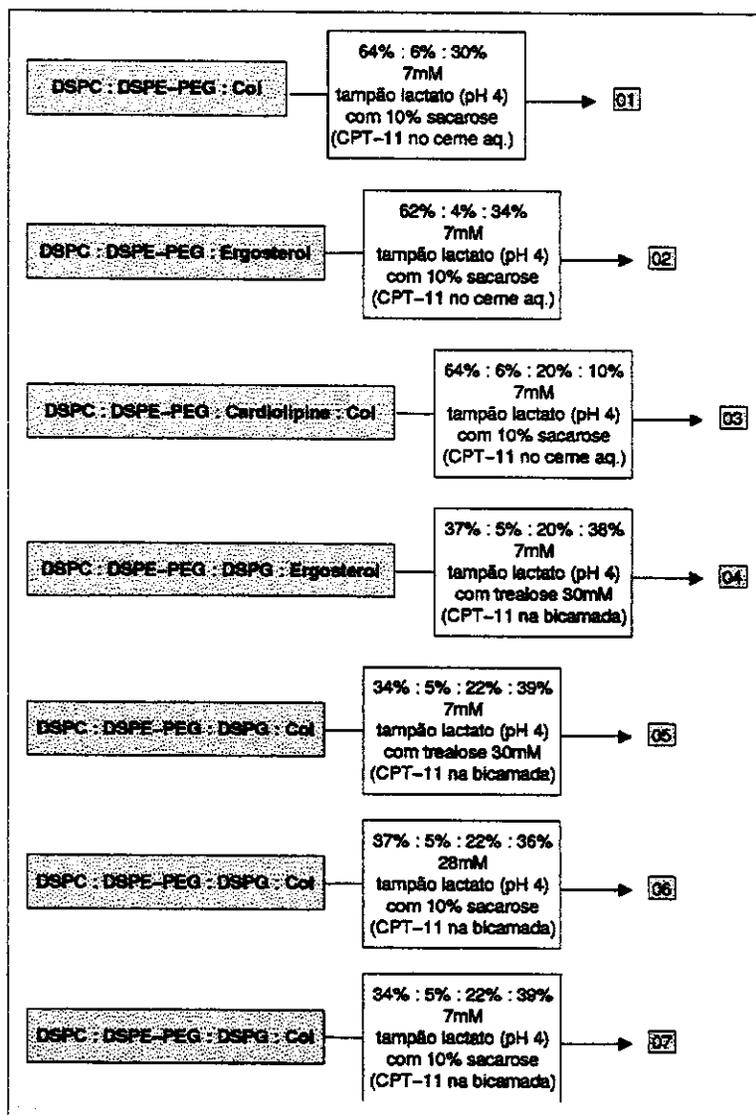
Com isso, de acordo com os experimentos realizados anteriormente, descritos no **Capítulo VI**, e com as hipóteses descritas no **Capítulo VII**, foram realizados outros experimentos, envolvendo ergosterol, cardiolipina, fosfatidilglicerol e outras concentrações de colesterol, com o objetivo de obter um sistema capaz de manter um gradiente de prótons, conforme mostra o Esquema 3.

O experimento 01 foi realizado para verificar o uso de apenas 30% (porcentagem molar) de colesterol, pois, conforme citado no **Capítulo VII**, esta quantidade de colesterol aparenta produzir simultaneamente baixas permeabilidades para prótons e para água e, conseqüentemente, menor transferência de prótons através dos agregados existentes na bicamada [Haines (2001)]. Apesar deste fato, este sistema não foi capaz de evitar a hidrólise rápida de CPT-11.

O experimento 02 envolveu o uso de ergosterol (um tipo de fitosterol), baseado nas suposições de Haines sobre o mecanismo de migração de prótons [Haines (2001)]. Infelizmente, também o ergosterol usado nestas condições não conseguiu minimizar a hidrólise do anel de lactona, apesar de constatarmos que a velocidade de hidrólise foi menor (dados não mostrados) que a verificada no experimento 01.

O experimento 03 foi realizado com a adição de cardiolipina na composição dos lipossomas. Da mesma forma que os experimentos anteriores, esta formulação não diminuiu a velocidade de hidrólise de CPT-11. Além de cardiolipina, mitocôndrias possuem, em sua membrana interna, ceramida, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina e fosfatidilglicerol (PG), sendo este presente em quantidade considerável, por ser o precursor da biosíntese de cardiolipina. Segundo Matsko e colaboradores, a mitocôndria possui poros conhecidos como poros de transição de permeabilidade [Matsko et al. (2001)]. Estes pesquisadores realizaram um estudo sobre a apoptose de mitocôndrias e descobriram que, durante este processo, estes poros abrem-se conforme ocorre a perda

de cardiolipina e, principalmente, de grande quantidade de PG, bem como o aumento da concentração de ceramida na membrana mitocondrial. Desta forma, podemos supor que PG e cardiolipina estejam relacionadas com o mecanismo de abertura dos poros da bicamada lipídica de mitocôndrias e, conseqüentemente, com o mecanismo de manutenção de um gradiente de prótons. Portanto, o uso de DSPG em nosso sistema poderia ajudar a evitar a hidrólise de CPT-11.



Esquema 3 – Fluxograma dos experimentos realizados. As proporções indicadas correspondem a porcentagens molares.

Com a aquisição de DSPG (doado pela Genzyme Pharmaceuticals) e de trealose, foram preparados os experimentos 04 e 05, conforme a formulação de

Sadzuka [Sadzuka et al. (1997)], que utiliza DMPG, mas usando concentração de lipídios de 7mM e a presença de trealose. Apesar do uso de DSPG combinado com trealose, no experimento 04 o ergosterol não foi capaz de evitar a hidrólise rápida de CPT-11. Entretanto, os testes de cinética de hidrólise para o experimento 04 (usando DSPC, DSPE-PEG, DSPG, colesterol em tampão com trealose) mostraram um resultado diferente dos obtidos anteriormente, como pode ser visto na Figura 29.

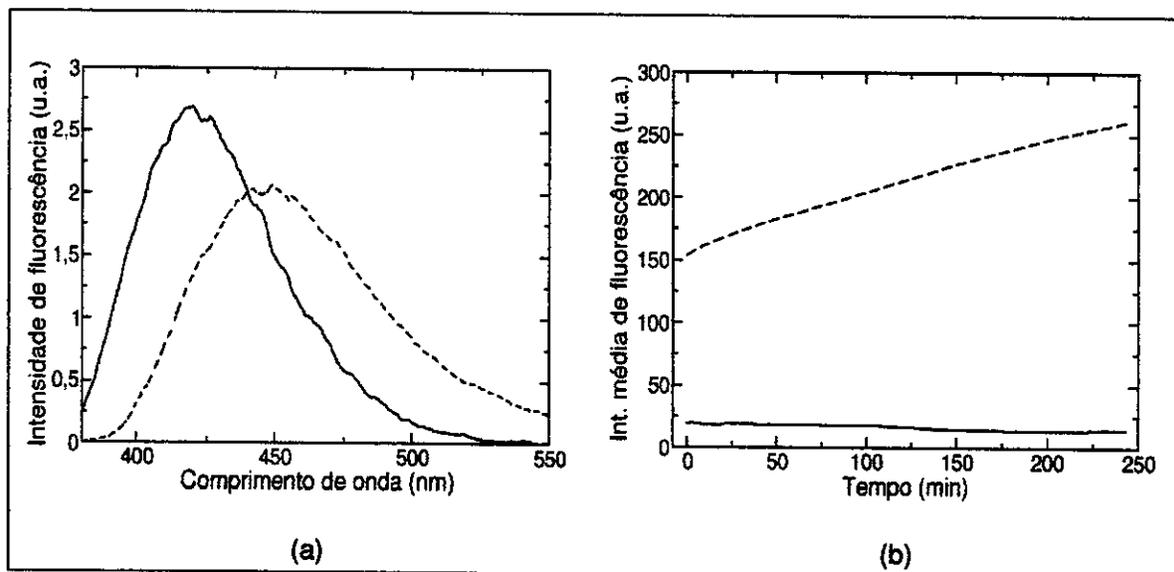


Figura 29 – (a) Espectros de emissão de fluorescência resolvidos e (b) perfis da intensidade média de fluorescência em função do tempo das formas lactona (—) e carboxilato (– –) de CPT-11:LUV (experimento 05 do Esquema 3), em tampão HEPES (pH 7,4) a 0,010mol/L com trealose 30mM, a 37°C.

O gráfico de perfis de intensidade média de fluorescência em função do tempo indica que a forma lactona permaneceu com fluorescência constante ao longo de 240min, embora a fluorescência da forma carboxilato só tenha aumentado. Este resultados não eram esperados, pois a fluorescência da espécie lactona deveria diminuir e da forma carboxilato deveria concomitantemente aumentar, se ocorresse hidrólise. Caso houvesse estabilização da forma lactona, sua fluorescência deveria permanecer alta. Com estes resultados, podemos supor que realmente ocorreu estabilização da forma lactona, presente nas bicamadas lipídicas em grande concentração e, por isso, houve supressão da fluorescência devido à alta concentração; e paralelamente, o aumento da fluorescência da forma carboxilato está relacionado com a entrada desta espécie, posicionada na bicamada mas próxima à interface da vesícula, para o interior

da bicamada, aumentando a fluorescência, devido à menor supressão.

A suposição de que a espécie carboxilato entrasse mais para o interior da bicamada, ou seja, ficasse mais afastada da interface, foi comprovada através de medidas de condutividade. Neste experimento, houve a diminuição da densidade de cargas da superfície dos lipossomas em função do tempo, indicando a entrada da espécie carboxilato (carregada negativamente) para o interior dos lipossomas. Com isso, apenas faltava comprovar a estabilização da forma lactona.

Antes de realizar um experimento para comprovar o que acontecia com a forma lactona nos lipossomas da formulação 05, foram preparadas duas outras formulações (experimentos 06 e 07), usando sacarose no tampão e alta concentração de lipídios. Estes dois experimentos apresentaram resultados semelhantes aos gráficos da Figura 29.

A suposição de que a forma lactona mantivesse estável, presente nas bicamadas lipídicas em grande concentração, foi avaliada a partir de experimentos sobre permeabilidade a prótons, baseados nos resultados com lipossomas de mielina [Díaz and Monreal (1994)], citados no **Capítulo VII**.

Conforme mencionado no **Capítulo VII**, a sonda fluorescente 9-aminoacridina (9AA) é um indicador fluorescente de pH, que sofre supressão de fluorescência quando presente em meio ácido, devido à sua protonação. Desta forma, esta sonda foi utilizada para monitorar a acidificação do cerne aquoso dos lipossomas.

Foram realizados dois ensaios experimentais: a primeira formulação envolveu a preparação de lipossomas (vazios) LUV, compostos por DSPC:DSPE-PEG:DSPG:colesterol na porcentagem molar 36%: 5%: 23%: 36%, em tampão lactato (pH 4,12) 10mM com sacarose 10% (m/v) (Figura 30); a segunda formulação lipossomal foi composta por DSPC:DSPE-PEG:DSPG:colesterol a 36%: 5%: 21%: 38% de porcentagem molar, em tampão lactato (pH 4,16) 10mM com trealose 30mM (Figura 31). As soluções tampão usadas em ambos os experimentos foram preparadas com os respectivos açúcares.

As Figuras 30 e 31 mostram que estes lipossomas, independentemente do açúcar usado, conseguiram manter um gradiente de pH, como no experimento de Díaz e Monreal, usando lipossomas de mielina [Díaz and Monreal (1994)].

Em ambas as Figuras, existe uma rápida supressão da fluorescência inicial, cuja magnitude foi dependente do Δ pH imposto, que quanto maior, mais rápida é a migração de 9AA para o interior da vesícula (observada pela inclinação da curva de supressão).

Após a supressão inicial, uma linha de base estável foi obtida, mesmo para o maior valor de ΔpH . Este fato indica que o gradiente de pH (ΔpH) permanece estável, ou seja, que não existe efluxo substancial de prótons do meio intravesicular (mais ácido) para o meio externo (menos ácido).

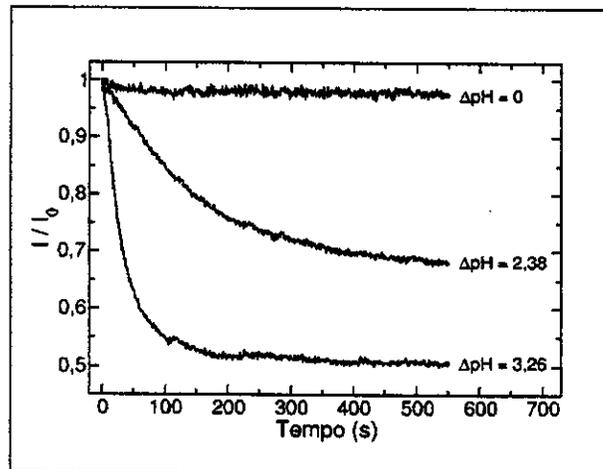


Figura 30 – Monitoramento da permeabilidade a prótons de lipossomas LUV, preparados com DSPC, DSPE-PEG, DSPG, colesterol em tampão lactato contendo sacarose 10% (m/v), em diferentes ΔpH , a partir da sonda fluorescente 9AA, de acordo com o experimento citado em [Díaz and Monreal (1994)], a 37°C, por 550s, $\lambda_{\text{exc}}=400\text{nm}$ e $\lambda_{\text{em}}=455\text{nm}$. O pH das soluções foram 4,12 ($\Delta\text{pH}=0$), 6,50 ($\Delta\text{pH}=2,38$) e 7,38 ($\Delta\text{pH}=3,26$).

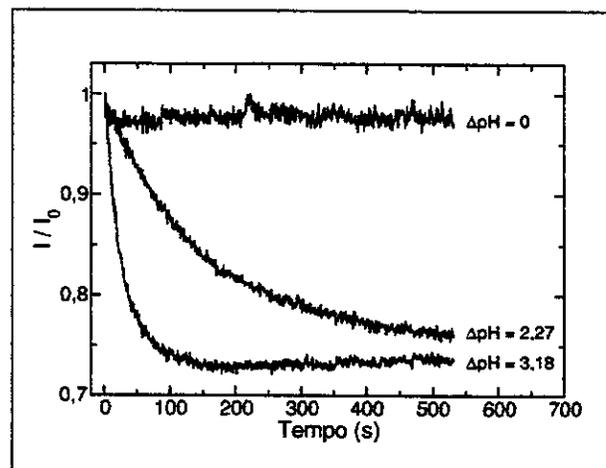


Figura 31 – Monitoramento da permeabilidade a prótons de lipossomas LUV, preparados com DSPC, DSPE-PEG, DSPG, colesterol em tampão lactato contendo trealose 30mM, em diferentes ΔpH , a partir da sonda fluorescente 9AA, de acordo com o experimento citado em [Díaz and Monreal (1994)], a 37°C, por 530s, $\lambda_{\text{exc}}=400\text{nm}$ e $\lambda_{\text{em}}=455\text{nm}$. O pH das soluções foram 4,16 ($\Delta\text{pH}=0$), 6,43 ($\Delta\text{pH}=2,27$) e 7,34 ($\Delta\text{pH}=3,18$).

A partir destes experimentos, pode-se concluir que: (1) a suposição de que a forma lactona mantivesse estável, presente nas bicamadas lipídicas em grande concentração, é verdadeira. Assim, conseguimos produzir uma formulação de lipossomas capaz de manter um gradiente de prótons por um longo intervalo de tempo, que era um dos objetivos principais deste trabalho; (2) estes lipossomas, pouco permeáveis a prótons, independem da concentração de lipídios (os experimentos 06 e 07 do Esquema 3 possuíam alta e baixa concentração de lipídios) e (3) do açúcar utilizado (sacarose e trealose); (4) o fosfolípido essencial para a manutenção deste gradiente é o fosfatidilglicerol (PG), e por isso ele está presente em grandes quantidades em mielina e mitocôndrias. Embora a cardiolipina seja um difosfatidilglicerol, somente PG tem a capacidade de manter o gradiente transmembrânico de pH nos lipossomas produzidos neste trabalho.

Não existem registros na literatura sobre um sistema de lipossomas, usando fosfolípidios comerciais, que realmente consiga manter um gradiente de pH, caracterizado físico-quimicamente. Assim, após muitas tentativas experimentais, finalizamos nosso projeto com sucesso.

Capítulo IX

Conclusão

Os objetivos deste trabalho foram: (1) estabelecer o princípio de hidrólise do fármaco CPT-11 e avaliar se existe a estabilização da forma lactona de CPT-11 na presença de HSA e se ocorrem mudanças na estrutura secundária desta proteína; e (2) encapsular e caracterizar os lipossomas estericamente estabilizados contendo CPT-11, em um sistema que mantenha um gradiente transmembrânico de pH, a fim de estabilizar a forma lactona intacta por um grande intervalo de tempo.

Na primeira parte do trabalho, propusemos um mecanismo de reação entre CPT-11 e albumina (HSA), baseado no tratamento quimiométrico dos dados espectroscópicos, onde em condições fisiológicas, existe a formação de uma nova espécie, devido à rápida complexação entre HSA e a forma lactona, produzindo um espectro diferente se comparado com o da forma lactona livre. Entretanto, observamos que este complexo também é passível de hidrólise, apesar de, contrariamente, Mi e Burke afirmarem a estabilidade do fármaco na presença de HSA [Mi and Burke (1994a)]. Além disso, experimentos com estequiometria 1:1 de HSA:CPT-11 indicaram a ausência de interação entre o anel de lactona e HSA, contrariando as afirmações de Mi e Burke [Mi and Burke (1994a)]. Estas conclusões somente foram possíveis de serem obtidas a partir do uso de quimiometria, demonstrando a utilidade desta técnica.

Na segunda parte do projeto, enfrentamos o nosso grande desafio, que era como manter o composto CPT-11 na forma lactona em lipossomas estericamente estabilizados a 37°C, a partir da permanência de um gradiente transmembrânico de pH

em um longo intervalo de tempo. Muitos experimentos foram realizados, utilizando várias formulações lipossomais, mas sem sucesso. Existem vários trabalhos na literatura que especulam quais soluções poderiam viabilizar a manutenção de um gradiente de pH, mas sem resultados práticos. O trabalho de Díaz e Monreal é o único descrito na literatura, que demonstra, com experimentos bem elaborados e criteriosos, que lipossomas de mielina conseguem manter um gradiente transmembrânico de prótons, embora os autores desconheçam qual ou quais lipídios são responsáveis pela baixa permeabilidade a prótons.

Somente com a formulação de lipossomas LUV estericamente estabilizados, produzidos com os lipídios sintéticos DSPC, DSPE-PEG2000, DSPG e colesterol, contendo CPT-11, que o sucesso foi obtido. Estudos cinéticos sobre a hidrólise de CPT-11 encapsulado, complementados com estudos sobre a migração de prótons através da bicamada lipídica, monitorada a partir dos espectros de emissão de fluorescência de 9-aminoacridina em várias soluções tampão com diferentes pHs, indicaram que este sistema lipossomal consegue manter o fármaco CPT-11 estável, evitando sua hidrólise em pH fisiológico.

A partir destes experimentos, concluímos que estes lipossomas pouco permeáveis a prótons independem da concentração de lipídios e do açúcar utilizado (sacarose e trealose) e o fosfolípido essencial para a manutenção deste gradiente é o fosfatidilglicerol, por isso que ele está presente em grandes quantidades em mielina e mitocôndrias.

Acreditamos que a "primeira formulação lipossomal" que conseguiu manter a forma lactona estável tenha alcançado o sucesso por sorte e não por mérito, ou seja, tenha sido uma falha do destino, pelo fato de não ter sido reprodutível. Somente os lipossomas contendo PG tem a capacidade de manter o gradiente transmembrânico de pH no nosso sistema de lipossomas LUV, com reprodutividade.

Capítulo X

Perspectivas futuras

Nosso trabalho pode ser o ponto de partida para muitos outros projetos de pesquisa:

- Estudos sobre a preparação de lipossomas CPT-11:LUV em outras condições: ausência e presença de sacarose ou trealose, em várias concentrações; variação das porcentagens molares de lipídios; e viabilidade do uso de PC e PG provenientes de fontes naturais; ausência e presença de PE-PEG.
- Testes *in vitro* e *in vivo* da formulação CPT-11:LUV.
- Encapsulação em lipossomas de outros fármacos que necessitam de um sistema controlador de gradiente de pH, como Topotecan e outros derivados de Camptotecina.
- Autoescalamento para fins industriais.

Referências Bibliográficas

- [Arroyo et al. (1998)]: Arroyo, J.; Biondi de Lopes, A. C.; Bernik, D. L.; and Disalvo, E. A.; Surface packing of lipid bilayers in the gel state induced by osmotic stress as measured by the dimerization of merocyanine 540, *J. Colloid Interf. Sci.*, 203, 106–114, 1998.
- [Bonting et al. (1977)]: Bonting, S. L.; Van Breugel, P. J.; and Daemen, F. J.; Influence of the lipid environment of the properties of rhodopsin in the photoreceptor membrane, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 83, 175–189, 1977.
- [Booksh and Kowalski (1994)]: Booksh, K. S. and Kowalski, B. R.; Theory of analytical chemistry, *Anal. Chem.*, 66, A782–A791, 1994.
- [Brunner et al. (1980)]: Brunner, J.; Graham, D. E.; Hauser, H.; and Semenza, G. J.; Ion and sugar permeabilities of lecithin bilayers: comparison of curved and planar bilayers, *J. Membrane Biol.*, 57, 133–141, 1980.
- [Burke et al. (1995)]: Burke, T. G.; Munshi, C. B.; Mi, Z.; and Jiang, Y.; The important role of albumin in determining the relative human blood stabilities of the Camptothecin anticancer drugs, *J. Pharm. Sci.*, 84, 518–519, 1995.
- [Burke and Gao (1994)]: Burke, T. G. and Gao, X.; Stabilization of topotecan in low pH liposomes composed of distearoylphosphatidylcholine, *J. Pharm. Sci.*, 83, 967–969, 1994.
- [Carruthers and Melchior (1983)]: Carruthers, A. and Melchior, D. L.; Studies of the relationship between bilayer water permeability and bilayer physical state, *Biochemistry*, 22, 5797–5807, 1983.
- [Colbern et al. (1998)]: Colbern, G.T.; Dykes, D.J.; Engbers, C.; Musterer, R.; Hiller, A.;

- Pegg, E.; Saville, R.; Weng, S.; Luzzio, M.; Uster, P.; Amantea, M.; Working, P.K.; Encapsulation of the topoisomerase I inhibitor GL147211C in STEALTH liposomes: pharmacokinetics and antitumor activity in HT29 colon tumor xenografts, *Clin. Cancer Res.*, 4, 3077–3082, 1998.
- [Crowe and Crowe (1988)]: Crowe, J. H. and Crowe, L. M.; Trehalose and dry dipalmitoylphosphatidylcholine revisited, *Biochim. Biophys. Acta*, 946, 193–201, 1988.
- [Deamer and Nichols (1989)]: Deamer, D. W. and Nichols, J. W.; Proton flux mechanisms in model and biological membranes, *J. Membrane Biol.*, 107, 91–103, 1989.
- [Dey and Warner (1997)]: Dey, J. and Warner, I. M.; Spectroscopic and photophysical studies of the anticancer drug: Camptothecin, *J. Lumin.*, 71, 105–114, 1997.
- [Dey and Warner (1996)]: Dey, J. and Warner, I. M.; Excited state tautomerization of camptothecin in aqueous solution, *J. Photochem. Photobiol. A*, 101, 21–27, 1996.
- [Díaz et al. (1996)]: Díaz, R. S.; Fuchs, A. G.; and Monreal, J.; Ionic fluxes through myelin membrane vesicles, *J. Neurosci. Res.*, 43, 675–683, 1996.
- [Díaz and Monreal (1994)]: Díaz, R. S. and Monreal, J.; Unusual low proton permeability of liposomes prepared from the endogenous myelin lipids, *J. Neurochem.*, 62, 2022–2029, 1994.
- [Diaz et al. (1999)]: Diaz, S.; Amalfa, F.; Biondi de Lopez, A. C.; and Disalvo, E. A.; Effect of water polarized at the carbonyl groups of phosphatidylcholines on the dipole potential of lipid bilayers, *Langmuir*, 15, 5179–5182, 1999.
- [Duax et al. (1980)]: Duax, W. L.; Griffin, J. F.; Rohrer, D. C.; and Weeks, C. M.; Conformational analysis of sterols: comparison of X-ray crystallographic observations with data from other sources, *Lipids*, 15, 783–792, 1980.
- [Eaton (2002)]: Eaton, J. W.. GNU octave manual, Network Theory Ltd. , 2002.
- [Elamrani and Blume (1983)]: Elamrani, K. and Blume, A.; Effect of the lipid phase transition on the kinetics of H⁺/OH⁻ diffusion across phosphatidic acid bilayers, *Biochim. Biophys. Acta*, 727, 22–30, 1983.
- [Fendler (1982)]: Fendler, J. H.. Membrane mimetic chemistry, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1982.
- [Finkelstein (1987)]: Finkelstein, A.. Water movement through lipid bilayers, pores, and plasma membranes: theory and reality, Wiley, New York, 1987.
- [Fleury et al. (1997a)]: Fleury, F.; Kudelina, I.; and Nabiev, I.; Interactions of lactone, carboxylate and self-aggregated forms of camptothecin with human and bovine

- serum albumins, *FEBS Letters*, 406, 151–156, 1997.
- [Fleury et al. (1997b)]: Fleury, F.; Ianoul, A.; Berjot, M.; Feofanov, A.; Alix, A. J. P.; and Nabiev, I.; Camptothecin-binding site in human serum albumin and protein transformations induced by drug binding, *FEBS Letters*, 411, 215–220, 1997.
- [Haines (2001)]: Haines, T. H.; Do sterols reduce proton and sodium leaks through lipid bilayers?, *Prog. Lipid Res.*, 40, 299–324, 2001.
- [Hristova and Needham (1995)]: Hristova, K. and Needham, D.. Physical properties of polymer-grafted bilayers, in Lasic, D. and Martin, F., *Stealth Liposomes*, CRC Press, Boca Raton, 35–49, 1995.
- [Hübner and Blume (1998)]: Hübner, W. and Blume, A.; Interactions at the lipid-water interface, *Chem. Phys. Lipids*, 96, 99–123, 1998.
- [Johnston et al. (1984)]: Johnston, D. S.; Coppard, E.; Parera, G. V.; and Chapman, D.; Langmuir film balance study of the interactions between carbohydrates and phospholipid monolayers, *Biochemistry*, 23, 6912–6919, 1984.
- [Joliffe (1986)]: Joliffe, J.. *Principal Component Analysis*, Springer-Verlag, Berlin, 1986.
- [Jones (1995)]: Jones, M. N.; The surface properties of phospholipid liposome systems and their characterisation, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 54, 93–128, 1995.
- [Kehrer et al. (2001)]: Kehrer, D. F. S.; Soepenbergh, O.; Loos, W. J.; Verweij, J.; and Sparreboom, A.; Modulation of camptothecin analogues in the treatment of cancer: a review, *Anti-Cancer Drugs*, 12, 89–105, 2001.
- [Lakowicz (1983)]: Lakowicz, J. R.. *Principles of fluorescence spectroscopy*, Plenum Press, New York, 1983.
- [Lasic (1993)]: Lasic, D. D.. *Liposomes: from physics to applications*, Elsevier, Amsterdam, 1993.
- [Lawton and Sylvestre (1971)]: Lawton, W. H. and Sylvestre, E. A.; Self modeling curve resolution, *Technometrics*, 13, 617–633, 1971.
- [Lentz (1993)]: Lentz, B. R.; Use of fluorescent probes to monitor molecular order and motions within liposome bilayers, *Chem. Phys. Lipids*, 64, 99–116, 1993.
- [Li et al. (1988)]: Li, W.; Haines, T. H.; Katz, A.; and Avron, M.; Inhibition of H⁺/OH⁻ flux across phospholipid-bilayers by cholesterol and low concentrations of detergents, *Biophys. J.*, 53, A7, 1988.
- [Luzardo et al. (2000)]: Luzardo, M. C.; Amalfa, F.; Nuñez, A. M.; Díaz, S.; Biondi de Lopez, A. C.; and Disalvo, E. A.; Effect of trehalose and sucrose on the hydration and dipole potential of lipid bilayers, *Biophys. J.*, 78, 2452–2458, 2000.

- [Machida et al. (2000)]: Machida, Y.; Onishi, H.; Kurita, A.; Hata, H.; Morikawa, A.; and Machida, Y.; Pharmacokinetics of prolonged-release CPT-11-loaded microspheres in rats, *J. Control. Rel.*, 66, 159–175, 2000.
- [Marjan and Allen (1996)]: Marjan, J. M. J. and Allen, T. M.; Long circulating liposomes: past, present and future, *Biotechnol. Adv.*, 14, 151–175, 1996.
- [Massart et al. (1998)]: Massart, D. L. et. al.. Handbook of chemometrics and qualimetrics, Elsevier, Amsterdam, 1998.
- [Matsko et al. (2001)]: Matsko, C. M.; Hunter, O. C.; Rabinowich, H.; Lotze, M. T.; and Amoscato, A. A.; Mitochondrial lipid alterations during Fas- and radiation-induced apoptosis, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 287, 1112–1120, 2001.
- [Mi et al. (1995)]: Mi, Z.; Malak, H.; and Burke, T. G.; Reduced albumin binding promotes the stability and activity of Topotecan in human blood, *Biochemistry*, 34, 13722–13728, 1995.
- [Mi and Burke (1994a)]: Mi, Z. and Burke, T. G.; Marked interspecies variations concerning the interactions of Camptothecin with serum albumins: a frequency-domain fluorescence spectroscopy study, *Biochemistry*, 33, 12540–12545, 1994.
- [Mkheian et al. (1981)]: Mkheian, E. E.; Sotskii, O. P.; Akopov, S. E.; and Badzhinian, S. A.; Certain physical parameters of cerebroside and phospholipid-cerebroside membranes, *Biofizika*, 26, 137–138, 1981.
- [Nabiev et al. (1998)]: Nabiev, I.; Fleury, F.; Kudelina, I.; Pommier, Y.; Charton, F.; Riou, J. F.; Alix, A. J. P.; and Manfait, M.; Spectroscopic and biochemical characterisation of self-aggregates formed by antitumor drugs of the Camptothecin family, *Biochem. Pharmacol.*, 55, 1163–1174, 1998.
- [New (1989)]: New, R. R. C.. Liposomes: a practical approach, IRL Press, New York, 1989.
- [Nichols and Deamer (1980)]: Nichols, J. W. and Deamer, D. W.; Proton-hydroxide permeability of large unilamellar liposomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 2038–2042, 1980.
- [O'Leary and Muggia (1998)]: O'Leary, J. and Muggia, F. M.; Camptothecins: a review of their development and schedules of administration, *Eur. J. Cancer*, 34, 1500–1508, 1998.
- [Papahadjopoulos (1971)]: Papahadjopoulos, D.; Na⁺ –K⁺ discrimination by "pure" phospholipid membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, 241, 254–259, 1971.
- [Papahadjopoulos et al. (1972)]: Papahadjopoulos, D.; Nir, S.; and Oki, S.; Permeability

- properties of phospholipid membranes: effect of cholesterol and temperature, *Biochim. Biophys. Acta*, 266, 561–583, 1972.
- [Parsegian (1969)]: Parsegian, A.; Energy of an ion crossing a low dielectric membrane: solutions to four relevant electrostatic problems, *Nature (London)*, 221, 844–846, 1969.
- [Paula et al. (1996)]: Paula, S.; Volkov, A. G.; Van Hoek, A. N.; Haines, T. H.; and Deamer, D. W.; Permeation of protons, potassium ions, and small polar molecules through phospholipid bilayers as a function of membrane thickness, *Biophys. J.*, 70, 339–348, 1996.
- [Paula and Deamer (1999)]: Paula, S. and Deamer, D. W.; Membrane permeability barriers to ionic and polar solutes, *Curr. Top. Membranes*, 48, 77–95, 1999.
- [Petitpas (2001)]: Petitpas, I.; Bhattacharya, A. A.; Twine, S.; East, M.; and Curry, S.; Crystal structure analysis of warfarin binding to human serum albumin, *J. Biol. Chem.*, 276, 22804–22809, 2001.
- [Ribas (1997)]: Ribas, A. M.. Estudo da estabilidade de bicamadas lipídicas em presença de tensoativos. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1997.
- [Sadzuka et al. (1999)]: Sadzuka, Y.; Hirotsu, S.; and Hirota, S.; Effective irinotecan (CPT-11)-containing liposomes: intraliposomal conversion to the active metabolite SN-38, *Jpn. J. Cancer Res.*, 90, 226–232, 1999.
- [Sadzuka et al. (1997)]: Sadzuka, Y.; Hirotsu, S.; Miyagishima, A.; Nozawa, Y.; and Hirota, S.; The study of polyethyleneglycol-coated liposomes containing CPT-11, *J. Liposome Res.*, 7, 241–260, 1997.
- [Shenderova et al. (1997)]: Shenderova, A.; Burke, T. G.; and Schwendeman, S. P.; Stabilization of 10-hydroxycamptothecin in poly(lactide-co-glycolide) microsphere delivery vehicles, *Pharmac. Res.*, 14, 1406–1414, 1997.
- [Shenderova et al. (1999)]: Shenderova, A.; Burke, T. G.; and Schwendeman, S. P.; The acidic microclimate in poly(lactide-co-glycolide) microspheres stabilizes camptothecins, *Pharmac. Res.*, 16, 241–248, 1999.
- [Singer et al. (1980)]: Singer, M. A.; Jain, M. K.; and Can, J.; Interaction of four local anesthetics with phospholipid bilayer membranes: permeability effects and possible mechanisms, *Biochemistry*, 58, 815–821, 1980.
- [Stryer (1995)]: Stryer, L.. *Biochemistry*, Freeman, New York, 1995.
- [Stuart et al. (2001)]: Stuart, J. A.; Cadenas, S.; Jekabsons, M. B.; Roussel, D.; and

- Brand, M. D.; Mitochondrial proton leak and the uncoupling protein 1 homologues, *Biochim. Biophys. Acta*, 1504, 144–158, 2001.
- [Trefethen and Bau III (1997)]: Trefethen, L. N. and Bau III, D.. Numerical linear algebra, SIAM, Philadelphia, 1997.
- [Underberg et al. (1990)]: Underberg, W. J. M.; Goossen, R. M. J.; Smith, B. R.; and Beijnen, J. H.; Equilibrium kinetics of the new experimental antitumor compound SK&F 104864–A in aqueous solution, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 8, 681–683, 1990.
- [Valtersson et al. (1985)]: Valtersson, C.; Van Duyn, G.; Verkleij, A. J.; Chojnacki, T.; De Kruijff, B.; and Dallner, G.; The influence of dolichol, dolichol esters, and dolichyl phosphate on phospholipid polymorphism and fluidity in model membranes, *J. Biol. Chem.*, 260, 2742–2751, 1985.
- [Venema et al. (1993)]: Venema, K.; Gibrat, R.; Grouzis, J. P.; and Grignon, C.; Quantitative measurement of cationic fluxes, selectivity and membrane potential using liposomes multilabelled with fluorescent probes, *Biochim. Biophys. Acta*, 1146, 87–96, 1993.
- [Verhoeven (1996)]: Verhoeven, J. W.; Glossary of terms used in photochemistry (IUPAC Recommendations 1996), *Pure and Appl. Chem.*, 68, 2223–2286, 1996.
- [Wold et al. (1987)]: Wold, S.; Esbensen, K.; and Geladi, P.; Principal component analysis, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 2, 37–52, 1987.
- [Woodle et al. (1991)]: Woodle, M. C.; Martin, F. J.; Yau–Young, A.; and Redemann, C. T.; Liposomes with enhanced circulation time, U. S. Patent Documents, , No. 5.013.556, 1991.
- [Working et al. (1999)]: Working, P. W.; Slater, J.; Colbern, G.; Schellens, J.; Zamboni, W.; Huang, A.. Encapsulation of cytotoxic drugs in STEALTH liposomes: relationship of pharmacokinetics, toxicity and activity, IV International Conference Liposome Advances. Progress in drug and vaccine delivery, 13–17 de dezembro de 1999.
- [Yang et al. (1999)]: Yang, S. C.; Lu, L. F.; Cai, Y.; Zhu, J. B.; Liang, B. W.; and Yang, C. Z.; Body distribution in mice of intravenously injected camptothecin solid lipid nanoparticles and targeting effect on brain, *J. Control. Rel.*, 59, 299–307, 1999.
- [Zalipsky (1995)]: Zalipsky, S.. Polyethylene glycol–lipid conjugates, in Lasic, D. and Martin, F., *Stealth Liposomes*, CRC Press, Boca Raton, 93–102, 1995.

Apêndice

Método quimiométrico – rotina computacional

Para a aplicação do método quimiométrico, conhecido como *Self Modeling Curve Resolution*, comentado no **Capítulo III**, uma rotina computacional foi implementada, no pacote matemático Octave⁶, por Ricardo Biloti. Abaixo, incluímos o código fonte da rotina:

```
# [F,C] = selfmodel(lambda,T,Y,grace)
#
# Metodo de Lawton e Sylvestre para a resolução dos espectros
# puros de uma mistura com duas substâncias.
#
# Entrada:
#
# lambda - vetor dos comprimentos de onda usados na
# leitura (length(lambda) = n)
#
# T - Tempo das leituras
#
# Y - matriz dos experimentos. Cada linha corresponde
# a um experimentos. (size(Y) = m x n)
#
# grace - Se for igual a 1, gera arquivos sm-grace-n.dat
# para posterior plotagem no Grace (opcional)
#
# Saída:
#
# F - banda espectral para as duas substâncias
# 1a. substâncias f1:
#
# min{F(:,1),F(:,2)} <= f1 <= min{F(:,1),F(:,2)}
#
# 2a. substância f2:
#
# min{F(:,3),F(:,4)} <= f2 <= min{F(:,3),F(:,4)}
```

6 O pacote GNU/Octave está disponível em www.octave.org sob a licença GPL. Para maiores informações, consulte a página do projeto ou veja [Eaton (2002)].

```

#
#
# ** Se a hipótese de que haja lambda1 e lambda2 tais que
#
#     f1(lambda1) > 0   e f2(lambda1) = 0
#     f1(lambda2) = 0   e f2(lambda2) > 0
#
#     para todos os experimentos, for verdadeira, então
#
#     f1 = F(:,1)
#     f2 = F(:,4)
#
#     Nessa situação,
#
#     C - matriz de concentrações.
#     C(:,1) - 1a. substância e C(:,2) - 2a. substância.
#
# Implementação de Ricardo Biloti baseada em
#
# LAWTON, W. H. and SYLVESTRE, E. A., "Self Modeling Curve Resolution",
# Technometrics, Vol. 13, No. 3, 617--633, 1971.
function [F,C] = selfmodel(lambda,T,Y,grace)

    [m,n] = size(Y);

    printf("%i experimentos com %i amostras cada\n",m,n);
    if (m > n)
        printf("Mais experimentos que amostras!\n");
    endif

    [U,S,V] = svd(Y);

    # Faz com que a primeira linha de V
    # seja toda positiva
    V = -V;
    U = -U;

    if ( (min(V(:,1)) < 0) || (max(V(:,1)) < 0) )
        printf("-----\n");
        printf("ERRO: Primeiro auto vetor V1 tem componentes negativas.\n");
        printf("      min(V1) = %f max(V1) = %f\n",min(V(:,1)),max(V(:,1)));
        printf("Resultados não confiáveis!\n");
        printf("-----\n");
    endif

    soma = sum(diag(S));
    printf("\nValores sigulares:\n n      valor      perc      acum\n");
    printf("-----\n");
    for i=1:min([m n])
        printf("%2i:  %e  (%5.2f%%)  (%6.2f%%)\n",
            i, S(i,i), 100*S(i,i)/soma, 100*sum(diag(S(1:i,1:i)))/soma);
    endfor
    printf("-----\n");

    v1 = V(:,1)';
    v2 = V(:,2)';

    x1 = U*S;
    x11 = x1(:,1);
    x12 = x1(:,2);

    Ymodel = x11 * V(:,1)' + x12 * V(:,2)';

    gset nokey;

    Kmais = find(v2 >= 0);
    Kmenos = find(v2 < 0);

    a = max(-v1(Kmais) ./ v2(Kmais));
    b = min(-v1(Kmenos) ./ v2(Kmenos));

    c = min(x12./x11);
    d = max(x12./x11);

    g = max([a d]);
    h = min([b c]);

    # Assume que as medidas são feitas a
    # intervalos regulares no parâmetro de
    # amostragem (comprimento de onda, por
    # exemplo).
    dlambdas = lambda(2) - lambda(1);
    Dlambdas = lambda(n) - lambda(1);

    c1 = sum(v1) * dlambdas/Dlambdas;
    c2 = sum(v2) * dlambdas/Dlambdas;

```

```

xilmin = 0;
xilmax = max(xil);

xi2min = -max(min(abs(xi2)), max(abs(xi2)));
xi2max = -xi2min;

Xil = (xilmin: (xilmax-xilmin)/5 :xilmax)';

rb = Xil * b;
rd = Xil * d;

rc = Xil * c;
ra = Xil * a;

r = (1 - c1 * Xil)/c2;

figure(1);
title("Regiões I (azul) e II (vermelho)");

plot(Xil, rb, 'b',
      Xil, rd, 'b',
      Xil, rc, 'r',
      Xil, ra, 'r');

gset pointsize 2

hold on
for i=1:m
    plot(xil(i),xi2(i),'ok')
endfor

flmais = [ 1 b ] / (c1 + c2 * b);
flmenos = [ 1 g ] / (c1 + c2 * g);

f2mais = [ 1 h ] / (c1 + c2 * h);
f2menos = [ 1 a ] / (c1 + c2 * a);

plot(flmais(1), flmais(2), '+b',
      flmenos(1), flmenos(2), '+b',
      f2mais(1), f2mais(2), '+r',
      f2menos(1), f2menos(2), '+r');
hold off

figure(2);
subplot(211);
title("Dados originais");
plot(lambda, Y');

subplot(212);
title("Dados modelados");
plot(lambda, Ymodel');

figure(3);
title("Bandas espectrais");

Flmais = flmais(1) * v1 + flmais(2) * v2;
Flmenos = flmenos(1) * v1 + flmenos(2) * v2;

F2mais = f2mais(1) * v1 + f2mais(2) * v2;
F2menos = f2menos(1) * v1 + f2menos(2) * v2;

F = [Flmais' Flmenos' F2mais' F2menos'];

for i=1:2:n-2

    B1(2*i-1:2*i+3) = [F(i,1) F(i,2) F(i+1,2) F(i+1,1) F(i+2,1)];
    B2(2*i-1:2*i+3) = [F(i,3) F(i,4) F(i+1,4) F(i+1,3) F(i+2,3)];
    L(2*i-1:2*i+3) = [lambda(i) lambda(i) lambda(i+1) lambda(i+1) \
                    lambda(i+2)];
endfor

plot(L, B1, 'b',
      lambda, F(:,1), 'b',
      lambda, F(:,2), 'b',
      L, B2, 'r',
      lambda, F(:,3), 'r',
      lambda, F(:,4), 'r');

figure(4);
title("Espectros normalizados para intensidade média unitária (assumindo
separabilidade)");
plot(lambda, F(:,1), 'b', lambda, F(:,4), 'r');

n = [ flmais ;
      f2menos ];

```

```

# 'Concentracoes'
alpha = (xi1 * n(2,2) - xi2 * n(2,1))/det(n);
beta = (xi2 * n(1,1) - xi1 * n(1,2))/det(n);
C = [alpha beta];

figure(5);
title("Intensidade média");
plot(T,alpha,'b', T, beta, 'r');

figure(6);
title("Dados modelados usando espectros separados");

YY = alpha * F1mais + beta * F2menos;
plot(lambda,YY)

# Saidas para o Grace
if ((nargin > 3) && (grace == 1))
    espectros = [lambda F(:,1) F(:,4)];
    intensidades = [T C(:,1) C(:,2)];

    banda1 = [F(:,1)' (flipud(F(:,2)))' F(1,1)]';
    banda2 = [F(:,3)' (flipud(F(:,4)))' F(1,3)]';
    blambd = [lambda' (flipud(lambda))' lambda(1)]';

    bandas = [blambd banda1 banda2];
    clear banda1 banda2 blambd

    dados = [lambda Y'];

    save -ascii sm-grace-1.dat espectros
    save -ascii sm-grace-2.dat intensidades
    save -ascii sm-grace-3.dat bandas
    save -ascii sm-grace-4.dat dados
endif
endfunction

```