

## 2 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)

### 2.1. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são definidos como compostos com anéis aromáticos fundidos e que não contêm nenhum heteroátomo ou grupo funcional(MOSS, 1998). No entanto, alguns compostos com heteroátomos ou grupos funcionais são normalmente categorizados como HPAs devido às similaridades das propriedades físico-químicas e difícil separação(AREY et al., 2010). O termo adequado para estes compostos seria compostos policíclicos aromáticos (CPAs) ou derivados de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (dHPAs)(MOSS, 1998).

Os HPAs são originados da combustão incompleta de compostos de carbono, da reação de compostos orgânicos ou são biossintetizados por alguns organismos(LAFLAMME; HITES, 1978). O ser humano é exposto a HPAs tanto através da combustão incompleta de carbono como através do uso de hidrocarbonetos de origem fóssil.

A Agência Internacional para Pesquisa em Câncer tem identificado o aumento de risco de câncer através de 60 HPAs e exposições a materiais contendo HPAs(AREY et al., 2010). Não obstante ela não indica ou aconselha a existência de limites para HPAs. Na maioria dos casos os resultados não são concluintes sobre o aumento de risco de câncer em humanos e se limita a identificar a possível carcinogênese química de alguns HPAs.

A carcinogênese é definida como a criação ou indução de câncer(AREY et al., 2010), sendo a carcinogênese química a indução de câncer por compostos químicos ou mistura de compostos químicos. Câncer é existência de neoplasmas malignos(AREY et al., 2010). Um neoplasma ou tumor é um tecido orgânico resultado de um crescimento anormal das células, e são malignos quando destroem os tecidos vizinhos.

A carcinogênese pode ser classificada mecanisticamente ou operacionalmente. O mecanismo pode ser dividido em três etapas:

1. Mutação. Caracteriza-se por eventos genotóxicos originados por compostos químicos que modifica a informa o genética.
2. Eventos epig nicos. São altera es no momento da transcri o genética e não na informa o genética.
3. Prolifera o.   a sobrevivência e/ou multiplica o da célula. A célula modificada evita os apoptoses (morte programada da célula). As células modificadas competem com as células normais e se multiplicam resultando em câncer.

O modo em que a carcinogênese opera pode ser dividido em três etapas:

1. Inicia o. O composto muda o ácido desoxirribonucleico (ADN) e/ou muda a transcri o genética. O ADN pode ser reparado, então   um processo reversível.
2. Promo o. Os compostos carcinogênicos podem ser promovedores por diversos mecanismos: evitar a repara o do ADN, ativar a modifica o do ADN sem modificar diretamente, aumentar a atividade dos modificadores do ADN, aumentar a genotoxicidade, etc. A promo o   também um processo reversível.
3. Progresso. Refere-se ao aumento do número de células com a nova impressão genética que, se for invasivo, resulta em câncer. Este   um processo irreversível.

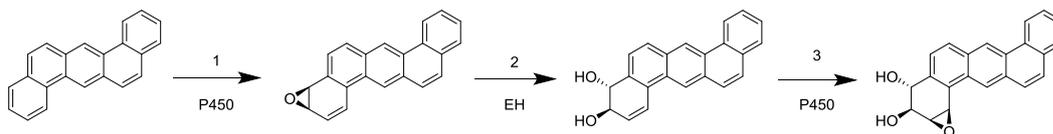
Em geral, os HPAs ligam-se covalentemente ao ADN e às proteínas, resultando em modifica es da informa o genética, ou interferindo na transcri o genética, na replica o do ADN e na síntese de proteínas. Os HPAs são identificados como genotóxicos e como causadores de eventos epig nicos. Outra importante propriedade que pode determinar a toxicidade dos HPAs   a afinidade com os receptores Ah (do inglês aryl hydrocarbon receptor, AhR ou AHR), e conseqentemente, com a diminui o das regula es nas transcri es genéticas, resultando no aumento dos eventos epig nicos. No entanto, a identifica o de HPAs que são unicamente causadores do aumento de eventos epig nicos s  ganharam muito interesse recentemente (AREY et al., 2010; BERTAZZI et al., 1984).

Até a forma o dos metabólitos carcinogênicos, os HPAs têm que passar pelas seguintes etapas (BOSTR M et al., 2002):

1. Intermediários eletrolíticos que são metabolizados pelo citocromo P450.

2. Desativação dos reagentes eletrolíticos pela enzima epóxi hidrolase (EH), que tem a função transformar os epóxidos em trans-dihidrodióis.
3. Transporte ativo de metabólitos polares, onde o citocromo aumenta a difusão do HPA epoxidando-o novamente.

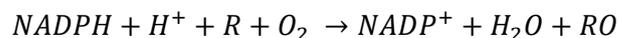
Estas três etapas são representadas na Figura 2-1.



**Figura 2-1 Esquema das etapas de formação do metabólito carcinogênico do DBahA. Adaptado de Shou(SHOU et al., 1996)**

### 2.1.1. Citocromos

O grupo de enzimas citocromo P450 (CYP ou P450) é reconhecido pela oxidação de drogas, carcinogênicos e esteroides através da reação(GUENGERICH, 2003):



onde *R* e *RO* são o substrato e o produto, respectivamente.

Em mamíferos, os citocromos P450 estão inserido na membrana(GUENGERICH, 2003). A maioria dos citocromos encontra-se no retículo endoplasmático e outros na mitocôndria. O ser humano possui mais de cinquenta proteínas do citocromo P450(NELSON, 2003) onde quatorze são primariamente envolvidas no metabolismo de esteróis, quatro na oxidação de vitaminas lipossolúveis, e nove envolvidos no metabolismo de ácidos graxos. Não obstante, a atividade da maioria dos P450 é desconhecida.

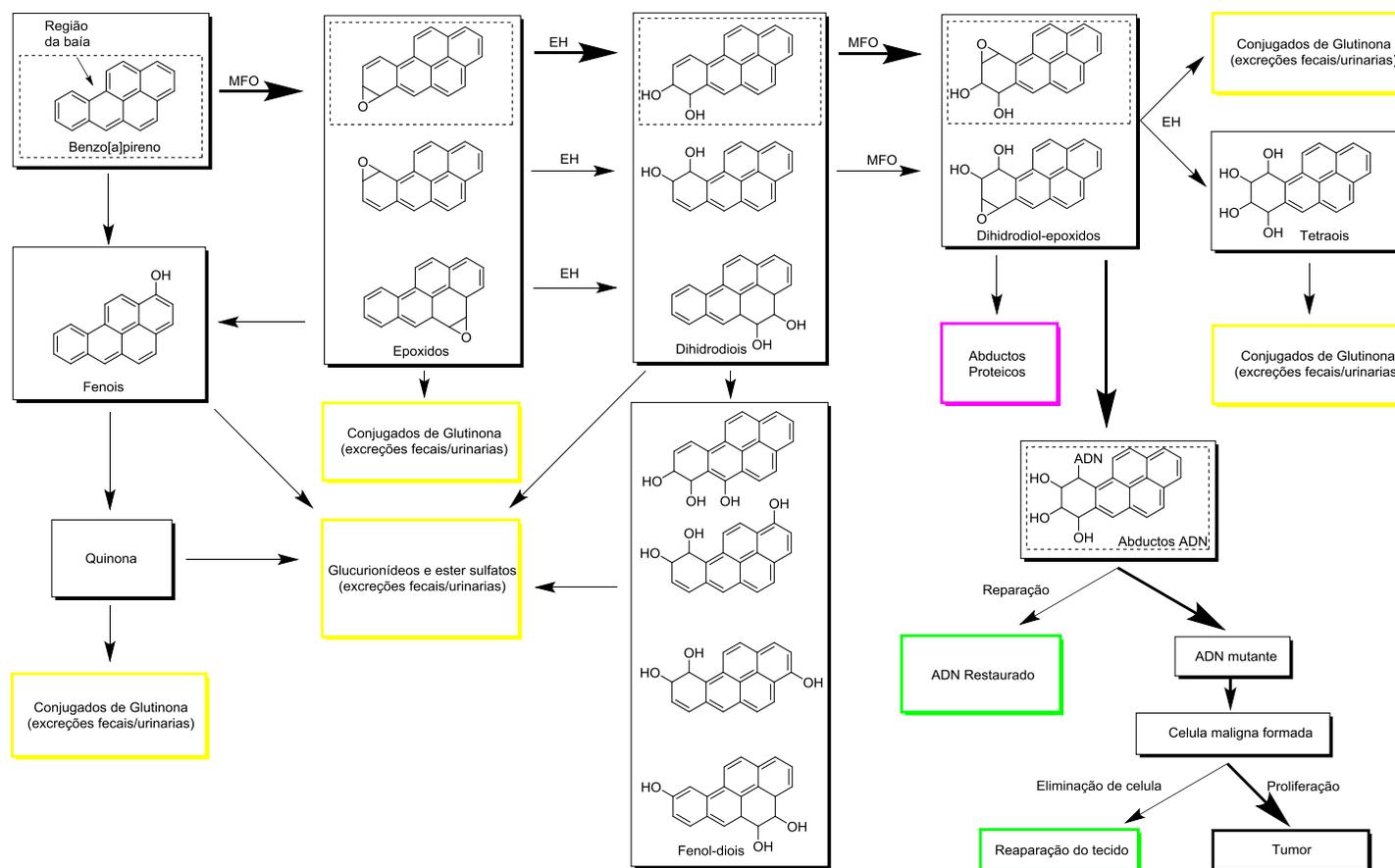
Algumas expressões do citocromo P450 são altamente reguladas, outras variam consideravelmente entre indivíduos, e também o efeito da ausência ou diminuição da expressão de um citocromo P450 individual varia(GUENGERICH, 2003). Ocasionalmente, algumas atividades podem ser feitas por outros citocromos P450, e em outras ocasiões esta diferença de expressão resulta em algumas doenças relacionadas a hormonas. Esta natureza difusa da seletividade do citocromo P450 resulta em pouca atenção de pesquisas farmacológicas no metabolismo dos fármacos, mas nos últimos 20 anos vêm-se publicando muita informação no tema, especialmente em pesquisas que caracterizam o citocromo

P450 no fígado humano. E agora alguns dos desvios na farmacocinética das pesquisas associadas ao citocromo P450 podem ser correlacionados facilmente (NAKAMURA et al., 1985).

As pesquisas sobre a influência do citocromo P450 no câncer são influenciados pelos citocromos P450 ativar carcinogênicos, e conseqüentemente, pela possibilidade de explorar a regulação citocromos P450 para a prevenção do câncer. Demonstrou-se que o controle na expressão do citocromo P450 pode modificar a susceptibilidade de câncer em animais (BUTERS et al., 1999; LIN et al., 2012). Mas ainda é muito difícil relacionar o controle das expressões do citocromo P450 e o risco de câncer. Como resultado das pesquisas indicaram-se vários citocromos P450 como presentes na ativação carcinogênica, CYP1A1, CYP1A2, CYP2E1 e CYP3A4, no entanto existem outros citocromos P450 que também são indicados com menor possibilidade.

Os principais citocromos relacionados com os HPAs são o P451A1, P451A2 e P451A3. Deve ser notado que não somente estes citocromos atuam em conjunto com os HPAs. Os HPAs podem ser metabolizados por vários mecanismos como é mostrado na Figura 2-2.

## Introdução



**Figura 2-2** Esquema apresentando as possíveis etapas de metabolização do BAP. Nos quadros pontilhado e setas em negrito, encontram-se as etapas de formação do metabólito carcinogênico do BAP. Adaptado de Guillén e Sopolana(GUILLÉN; SOPELANA, 2003).

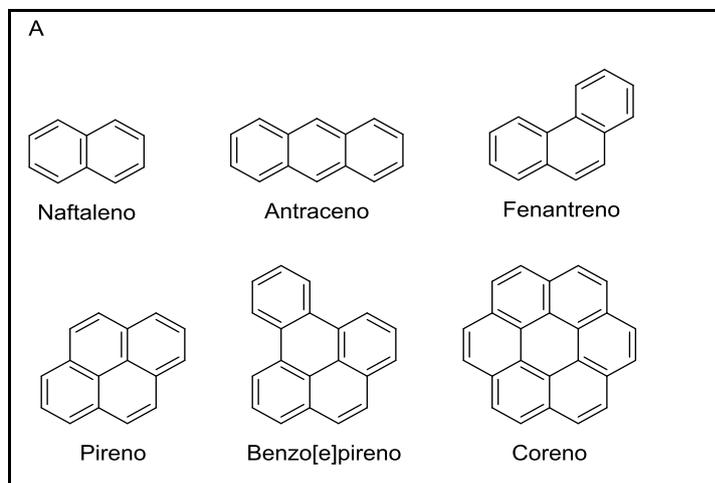
### 2.1.2. Propriedades comuns dos HPAs carcinogênicos

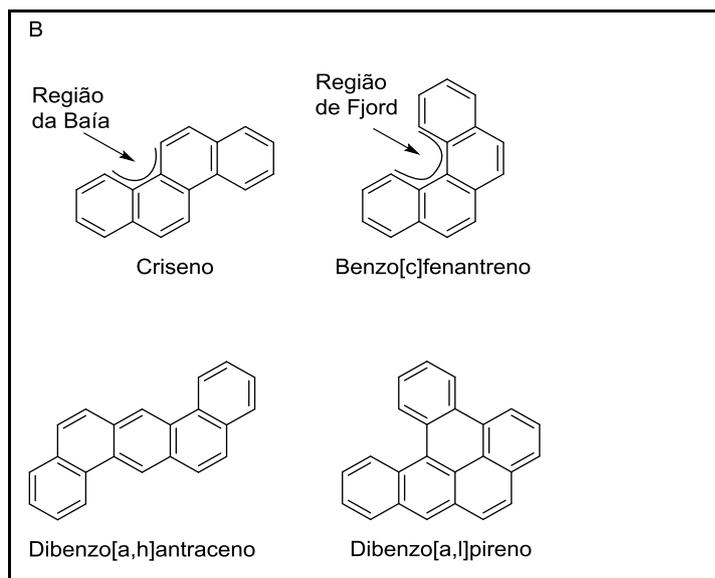
Dada a grande variedade de HPAs que podem ser encontrados em uma simples amostra é conveniente identificar facilmente se um HPA pode apresentar ou não potencial carcinogênico, tanto como mutagênico como promotor. Uma das características facilmente identificáveis é a existência de propriedades estruturais que indicam uma provável atividade carcinogênica. Pela natureza planar dos HPAs, esta identificação é mais simples do que com fármacos com estruturas tridimensionais mais complexas.

Demonstrou-se que para os HPAs terem atividade carcinogênica eles precisam normalmente apresentar algumas propriedades estruturais. Duas propriedades, independentes entre si, são altamente reconhecidas para identificar possível atividade mutagênica.

Uma estrutura característica que indica potencial carcinogênico em HPAs é a região da baía, mas os HPAs precisam ter no mínimo quatro anéis aromáticos. A estrutura mais simples com a região da baía que possui atividade mutagênica é o criseno, que tem quatro anéis aromáticos benzênicos. Outra característica estrutural que pode indicar atividade carcinogênica é a região de Fjord. O HPA mais simples que apresenta a região de Fjord e o potencial carcinogênico é o benzo[*c*]fenantreno, também com quatro anéis aromáticos benzênicos. As regiões da baía e de Fjord são representadas no Quadro 1.

Para apresentar atividade como promotor foi identificada a capacidade de poder entrar em um retângulo de  $6,8 \times 13,7 \text{ \AA}^2$ , na superfície do receptor Ah. Os HPAs que possuem esta característica apresentam alta atividade como promotor, e pode ser relacionada à presença da região da baía com um aumento na atividade dos HPAs como promotores.





**Quadro 1 A- HPAs sem atividade carcinogênica. B- HPAs carcinogênicos, ressaltando a região da baía e a região de Fjord. Adaptado de Boström(BOSTRÖM et al., 2002).**

A primeira pesquisa que relacionou os HPAs indiretamente com o aumento de incidência de câncer foi feita em 1775 onde o britânico Pott (apud(BOSTRÖM et al., 2002)) observou maior taxa de aparição de câncer de escroto em limpadores de chaminés, que possuem altas exposições a HPAs pelo contato com cinza. Um século depois von Volkman (1875) observou maior incidência de câncer de pele em trabalhadores da indústria de carvão (apud(BOSTRÖM et al., 2002)). A primeira pesquisa que relacionou diretamente os HPAs e câncer foi feita por Phillips em 1915 (apud(BOSTRÖM et al., 2002)). Phillips relacionou a formação de tumores em coelhos com contato cutâneo aos materiais contendo misturas de HPAs. Em 1920 provou-se que o Dibenzo[a,h]antraceno (DBahA) é carcinogênico utilizando testes feitos em ratos expostos a contato cutâneo com DBahA sintetizado (apud(BOSTRÖM et al., 2002)). Em 1930 provou-se que o Benzo[a]pireno (BaP) é carcinogênico através de testes feitos em roedores expostos a contato cutâneo de BaP isolado de resina(apud(BOSTRÖM et al., 2002)). Em conjunto com pesquisas posteriores vários HPAs foram considerados carcinógenos (BERTAZZI et al., 1984).

Com todas as incertezas existentes atualmente estão identificados uma série de HPAs carcinogênicos em humanos, chegando a regulação de HPAs individualmente por várias agências, como mostra no Quadro 2(KIM et al., 2013).

Agência	HPAs	Classificação carcinogênica
Agência de substâncias tóxicas e doenças registradas, Brasil.	Benzo[a]antraceno	Carcinôgeneses conhecida em animais
	Benzo[b]fluoranteno	
	Benzo[a]pireno	
	Dibenzo[a,h]antraceno	
	Indeno[1,2,3-c,d]pireno	
	Benzo[a]antraceno	Provável carcinogênico em humanos
	Benzo[a]pireno	
Agência internacional para pesquisa em câncer (IARC)	Benzo[a]fluoranteno	Possível carcinogênico em animais
	Benzo[k]fluoranteno	
	Ideno[1,2,3-c,d]pireno	
	Antraceno	Não classificável como carcinogênico em humanos
	Benzo[g,j,i]perileno	
	Benzo[e]pireno	
	Criseno	
	Fluoranteno	
	Fluoreno	
	Fenantreno	
	Pireno	
Agência de proteção ambiental estadunidense (US-EPA)	Benzo[a]antraceno	Provável carcinogênico em humanos
	Benzo[a]pireno	
	Benzo[b]fluoranteno	
	Benzo[k]fluoranteno	
	Criseno	
	Dibenzo[a,h]antraceno	
	Indeno[1,2,3-c,d]pireno	
	Acenaftileno	Não classificável como carcinogênico em humanos
	Antraceno	
	Benzo[g,h,i]perileno	
	Fluoranteno	

**Quadro 2 HPAs considerados como possíveis carcinogênicos segundo agências. Adaptado de Kim(KIM et al., 2013).**

### 2.1.3. HPAs no Pulmão

As exposições dos HPAs no pulmão ocorrem tanto em estado gasoso como pelo material particulado. Assim, os HPAs de menor massa molecular estão mais presentes no estado gasoso, diferentemente dos HPAs de massa molecular maior que 210 g mol<sup>-1</sup> que estão mais presentes no material particulado. Esta dualidade na exposição dos HPAs provoca erro nas estimativas de HPAs atmosférico. O quadro 3 mostra a porcentagem do total de HPA encontrado na fase de material particulado(KIM et al., 2013; POSSANZINI et al., 2004).

HPA	Percentagem total encontrado no material particulado	Massa molecular (g mol <sup>-1</sup> )
Naftaleno	2 %	128
Fluoreno	5 %	166
Acenafteno	4 %	154
Acenaftileno	11 %	152
Fenantreno	9 %	178
Antraceno	8 %	178
Fluoroanteno	16 %	202
Pireno	55 %	202
Benzo[a]antraceno	78 %	228
Criseno	89 %	228
Benzo[b]fluoranteno	85 %	252
Benzo[a]pireno	100 %	252
Benzo[e]pireno	83 %	252
Perileno	100 %	252
Benzo(ghi)perileno	100 %	276
Indeno[1,2,3-cd]pireno	100 %	276
Antantreno	100 %	276
Coreno	100 %	300

**Quadro 3** Partição de alguns HPAs entre o material particulado e a fase gasosa. Adaptado de Kim(KIM et al., 2013) e Possanzini(POSSANZINI et al., 2004).

De acordo com o Quadro 3 pode-se perceber que todos os HPAs maiores que o Benzo(a)pireno são distribuídos completamente na fase do material particulado, não se encontrado na fase gasosa. Pode-se inferir então o Dibenzo(a,h)antraceno encontra-se no material particulado, e não na fase gasosa. A capacidade de metabolização é menor no tecido pulmonar do que no fígado(BUTERS et al., 1999). Conseqüentemente, a retenção de HPAs em órgãos diferentes do fígado aumenta com doses efetivas dos HPAs e pela substancial diminuição da metabolização dos HPAs(ALEXANDROV; ROJAS; SATARUG, 2010). Quando os HPAs são inalados através do material particulado, a retenção dos HPAs aumenta no pulmão, especialmente os HPAs carcinogênicos(SUN et al., 1984).

#### 2.1.4.

#### HPAs na membrana celular e no surfactante pulmonar

Essencialmente por sua propriedade lipofílica os HPAs se distribuem preferencialmente no surfactante pulmonar e na membrana celular. No entanto,

os metabólitos possuem menor lipofilicidade, mostrando que os HPAs possuem menor atividade química em relação a seus metabólitos (REN et al., 2010).

A lipofilicidade é o fator principal que determina a adsorção de compostos orgânicos através do epitélio traqueobrônquico e na membrana celular. (BOSTRÖM et al., 2002). Quanto maior a lipofilicidade, menor a velocidade de passar através do epitélio traqueobrônquico.

As altas doses de HPAs localizadas no epitélio traqueobrônquico causam o principal questionamento na utilização das pesquisas em animais para estimar o aumento de risco de câncer ocasionado pela inalação dos HPAs (BOSTRÖM et al., 2002), mas também existe o questionamento sobre o uso de dados epidemiológicos de trabalhadores de fábricas de alumínio, porque a mistura de HPAs não necessariamente representa o perfil de outras fontes de emissão e existe a presença de outros compostos carcinogênicos (BOSTRÖM et al., 2002).

É possível que, em exposições de baixos níveis de HPAs, a contribuição do epitélio traqueobrônquico na metabolização domina sobre os metabólitos produzidos no fígado, que posteriormente transportar-se-iam ao pulmão por circulação sistêmica. No entanto, em exposições de altas concentrações de HPAs dominaria a metabolização no fígado (GUENGERICH, 2003).

Se são conhecidas as distribuições dos HPAs e seus metabólitos entre as membranas celulares e o pulmão, a concentração no plasma, e a capacidade de metabolização em distintos órgãos, seria possível estimar o nível de concentração de HPAs que uma pessoa está continuamente exposta. Isto melhoraria a estimativa do risco de câncer associado exclusivamente aos HPAs. Se a estrutura e a massa molecular influenciam significativamente na difusão dos HPAs, para cada HPA individual provavelmente existiriam diferenças no comportamento e no risco de câncer em altas e baixas concentrações. Também é útil conhecer como se comporta a difusão dos HPAs e metabólitos em relação a sua concentração para melhorar as metodologias de estimativa de risco de câncer no pulmão utilizando pesquisas feitas em animais.

## **2.2.**

### **Modelos de membrana celular e de Surfactante Pulmonar**

#### **2.2.1.**

##### **Interfaces**

Interface é o contorno entre duas fases que estão em contato. Estas fases podem ser sólidas, líquidas ou gasosas. A existência de fases distintas em lugar

de uma fase homogênea é resultado das interações menos favoráveis entre os componentes das distintas fases (PASHLEY; KARAMAN, 2005). Assim, a energia que resulta das interações entre fases (energia interfacial) e área interfacial tendem a ser mínima. Se a energia interfacial for favorável, a área interfacial aumentaria e tenderia ao infinito, ocorrendo a mistura completa das fases, que acontece quando os compostos das distintas fases são completamente miscíveis.

Quando a área superficial for a menor área possível, significa que existe uma energia associada ao aumento da área, que é resultado da coesão das moléculas na mesma fase. De uma maneira geral, as moléculas na superfície possuem maior energia do que as moléculas no interior da fase líquida. No caso de fluidos, as interações de coesão resultam em uma força que mantém a área interfacial mínima.

A tensão superficial pode ser definida com temperatura ( $T$ ), pressão ( $P$ ) e número de moléculas ( $n$ ) constantes através de:

$$\gamma = G^{sup} = \left( \frac{\partial G}{\partial A} \right)_{T,P,n}$$

onde  $G$  é a energia livre de Gibbs e  $A$  é a área interfacial. Assim, para aumentar a área deve ser adicionada energia com  $T$ ,  $P$  e  $n$  constantes. A mudança na energia livre pode ser resultado de uma mudança na entropia

$$dq = TdS = TS^{sup}dA$$

$$\left( \frac{\partial G}{\partial T} \right)_P = -S$$

podemos chegar a

$$\left( \frac{\partial G^{sup}}{\partial T} \right)_P = -S^{sup}$$

como resultado a entalpia de superfície é indistinguível com a energia de superfície a temperatura e pressão constante

$$E^s = H^s = G + TS^s$$

sendo esta energia mais fácil de modelar.

No entanto, é possível relacionar a energia livre de superfície  $G^{sup}$  com a pressão e volume, que é mais prático de medir ou modelar do que a entalpia e a entropia superficiais. Assim, a energia livre de superfície está relacionada com a pressão, o volume e a área de superfície por

$$\left( \frac{\partial \gamma}{\partial P} \right)_{A,T} = \left( \frac{\partial V}{\partial A} \right)_{P,T} = dV^{sup}$$

onde  $A$  denota a área e  $dV^s$  é a mudança do volume molar entre as moléculas na fase e as moléculas na interface. Estas propriedades são mais adequadas de medir em métodos computacionais, não obstante deve-se ter cuidado nos erros ocasionados pela existência de mais de um componente (devido a diferença de compressibilidade isotérmica) ou no método utilizado para manter a pressão e a temperatura constantes.

Se a pressão é expressa como

$$P = \frac{2}{3V} (E_{cin} - \Xi)$$

onde  $E_{cin}$  é a energia cinética dos compostos e

$$\Xi = -\frac{1}{2} \sum_{i < j} r_{ij} \otimes F_{ij}$$

é o tensor do virial, que é resultado das forças  $F_{ij}$  das interações da partícula  $j$  sobre a partícula  $i$ . Assim, a pressão também pode ser descrita a través do tensor:

$$P = \begin{bmatrix} P_{xx} & P_{xy} & P_{xz} \\ - & P_{yy} & P_{yz} \\ - & - & P_{zz} \end{bmatrix}$$

Supondo que a interface seja perpendicular ao eixo  $z$ , a tensão superficial  $\gamma_s$  em uma célula unitária de comprimento  $l_z$  é

$$\gamma_s = l_z \left( p_{zz} - \left( \frac{P_{xx} + P_{yy}}{2} \right) \right)$$

No caso da interface água/ar, o valor observado da tensão superficial é de  $72,8 \text{ mN m}^{-1}$ . Quando aumenta-se as interações não polares, a tensão superficial diminui (as interações são mais favoráveis). Na interface água/octano, esta energia interfacial reduz-se a  $50 \text{ mN m}^{-1}$ . Caso as interações entre as fases aumentem, a energia interfacial é reduzida. Por exemplo, aumentando a polaridade e possibilitando ligações de hidrogênio entre a água e o 1-octanol, a energia interfacial cai para  $8,5 \text{ mN m}^{-1}$ . (MYERS, 2005)

É evidente que um método simples para diminuir a tensão superficial entre fases é adicionar compostos com características similares às duas fases. É importante ressaltar que uma diminuição na tensão superficial significa uma diminuição na energia necessária para aumentar a área entre as fases. O uso de tensoativos equivale criar uma terceira fase, o que não necessariamente facilita o transporte de compostos entre as fases.

### 2.2.2. Tensioativos

Os tensioativos são compostos que possuem atividade na superfície ou na interface, ou seja, modificam a tensão superficial ou a energia de interface existente na área entre as duas fases (ADAMSON; GAST, 1997). Esta atividade sobre a energia de superfície resulta em vários fenômenos, como a formação de filmes, micelas, membranas, mudança na difusão de substâncias entre fases, etc.

Estas propriedades são resultado da existência de forças de coesão e repulsão dos tensioativos e dos componentes das distintas fases. Assim, os tensioativos são chamados de anfífilicos, isto é, possuem forças de coesão entre os compostos das distintas fases, normalmente uma parte hidrofílica e uma parte hidrofóbica. No entanto, existem tensioativos que possuem forças de repulsão entre as duas fases, como é o caso dos perfluorocarbonetos, sendo TEFLON® o mais conhecido, que é muito utilizado como antiaderente. Em resumo, o que determina muitas das propriedades de um tensioativo é a combinação das partes polar e apolar. Estas duas características em conjunto determinam a maioria das propriedades como a solubilidade, a capacidade de redução da tensão superficial, detergência, molhabilidade, espumação, emulsificação, dispersão, etc. Estas características dirigem a aplicação ou função final de cada tensioativo.

Tipicamente, o interesse em surfactantes está relacionado a alguma fase aquosa. Consequentemente, é comum dividir a estrutura dos tensioativos em uma parte hidrofílica e uma parte hidrofóbica. Através do tamanho e forma comum destas partes, os surfactantes podem ser caracterizados. A parte hidrofílica é chamada cabeça polar e a parte hidrofóbica é chamada cauda hidrofóbica. A chamada cabeça usualmente é menor em tamanho relativo à cauda. Normalmente, é altamente polar ou iônica e algumas vezes permite a formação de ligações de hidrogênio. Já a chamada cauda normalmente é um grupo de tamanho maior em relação à cabeça, e usualmente é uma cadeia hidrocarbônica, uma cadeia fluorocarbônica ou uma cadeia polimérica.

As propriedades da parte hidrofóbica (ou lipofílica) dos tensioativos muda pouco. Portanto, é comum classificar os tensioativos segundo seu componente hidrofílico. Pode-se então classificá-los em:

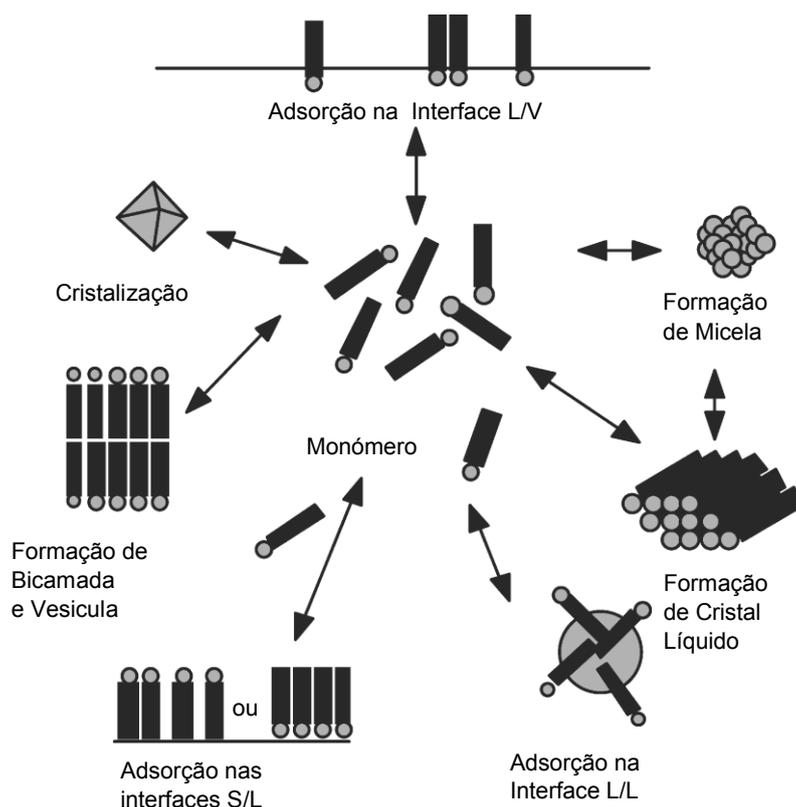
- Tensioativos aniônicos: onde a parte hidrofílica possui carga negativa ou ânion.

- Tensioativos catiônicos: onde a parte hidrofílica possui carga positiva ou cátion.
- Tensioativos zwitteriônicos: são tensioativos neutros que possuem um cátion e um ânion em sua estrutura.
- Tensioativos não iônicos: são tensioativos que não possuem grupos com cargas.
- Tensioativos anfotéricos: são substâncias com dupla polaridade, podem formar cátions e ânions, dependendo do pH do meio onde se encontram em dissociação. Em meio alcalino os anfóteros formam tensioativos aniônicos enquanto em meio ácido são tensioativos catiônicos.

Os tensioativos podem pertencer a várias categorias, normalmente os tensioativos com partes inorgânicas são aniônicos ou catiônicos, mas não anfóteros. Tensioativos iônicos (aniônicos ou catiônicos) anfóteros contêm grupos que influem o pH, como os grupos amônio (catiônico) ou sulfato (aniônico). Os zwitteriônicos anfóteros normalmente apresentam dois grupos com anfoterismo, um aniônico e um catiônico. Alguns tensioativos podem ser somente não iônicos, como é caso de alguns fluorotensioativos.

Os usos comuns dos tensioativos são como detergente, emulsificante, espumação, dispersante, umectação, aditivos em tintas e pinturas, adesivos, antiaderentes, revestimento de pontos quânticos, transporte de fármacos, produção de nanopartículas, e películas protetoras.

Como foi mencionado anteriormente os tensioativos agem diminuindo a energia interfacial, minimizando a repulsão e/ou maximizando as interações favoráveis. Na maioria das vezes, a adsorção do tensioativo na interface atinge o ponto de saturação da interface. No entanto, os compostos sempre procuram estar em um estado de menor energia. Então, para diminuir esta energia, os tensioativos utilizam outros mecanismos que conduzem à formação de outra estrutura (PASHLEY; KARAMAN, 2005). Tipicamente, os compostos cristalizam ou precipitam após exceder sua solubilidade, no entanto os surfactantes apresentam mesofases termodinamicamente estáveis mostradas na Ilustração 1.



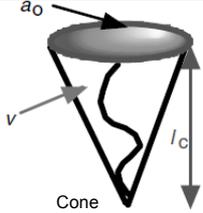
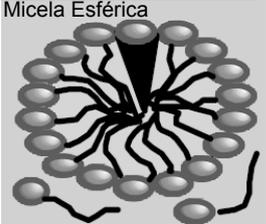
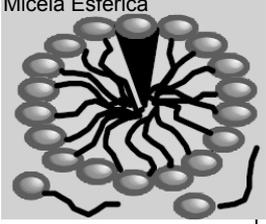
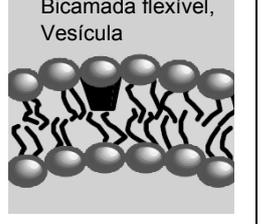
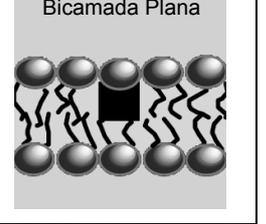
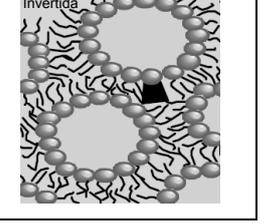
**Ilustração 1 Possíveis mesofases formadas por surfactantes.**  
Adaptado de Myers (MYERS, 2005).

Normalmente, o tipo de estrutura depende da proporção entre o surfactante e os componentes da fase, temperatura e pressão. Os tensoativos podem se aderir às interfaces líquido-gás, líquido-líquido, líquido-sólido, formar micelas, bicamadas, vesículas, cristais e cristais líquidos, dependendo das fases que estão presentes e da geometria e propriedades estruturais. O potencial tecnológico destas estruturas mantém o interesse da academia durante anos. No entanto, pelo fato do estado líquido ser o mais aleatório entre as fases condensadas, é difícil detectar estas estruturas.

Foi encontrado que existem dois fatores fundamentais que controlam qual estrutura pode se formar a partir de tensoativos: a temperatura e suas propriedades estruturais (ISRAELACHVILI; MITCHELL; NINHAM, 1976). Nesta área de pesquisa, é fundamental determinar as propriedades estruturais que são necessárias para a formação de uma estrutura. Israelachvili (ISRAELACHVILI; MITCHELL; NINHAM, 1976) mostrou que fatores de geometria controlam o empacotamento dos tensoativos e dos lipídios em distintas estruturas. Estes fatores de geometria são dados principalmente pelo parâmetro crítico de empacotamento (PCE) dado por  $\frac{v}{a_0 l_c}$ , onde  $v$  é o volume da porção hidrofóbica

## Introdução

da molécula,  $a_o$  é a área da porção hidrofílica do tensoativo e  $l_c$  é o comprimento crítico da parte hidrofóbica. Os agregados esperados em relação ao parâmetro de empacotamento crítico são:

Lipídio	Parâmetro crítico de empacotamento $\frac{v}{a_o l_c}$	Forma crítica de empacotamento	Estrutura formada
Lipídios de uma cauda com cabeça polar com grande área	$<1/3$	 Cone	 Micela Esférica
Lipídios de uma cauda com cabeça polar com pouca área.	$1/3-1/2$	 Cone truncado	 Micela Esférica
Lipídios de duas caudas com cabeça polar com grande área.	$1/2 - 1$	 Cone truncado	 Bicamada flexível, Vesícula
Lipídios de duas caudas com cabeça polar de área pequena.	$\sim 1$	 Cilindro	 Bicamada Plana
Lipídios de duas caudas com cabeça polar menor.	$>1$	 Cone Truncado Invertido	 Micela Invertida

**Quadro 4 Estruturas formadas segundo forma crítica de empacotamento e valores do parâmetro crítico de empacotamento. Adaptado de Pashley e Karaman (PASHLEY; KARAMAN, 2005).**

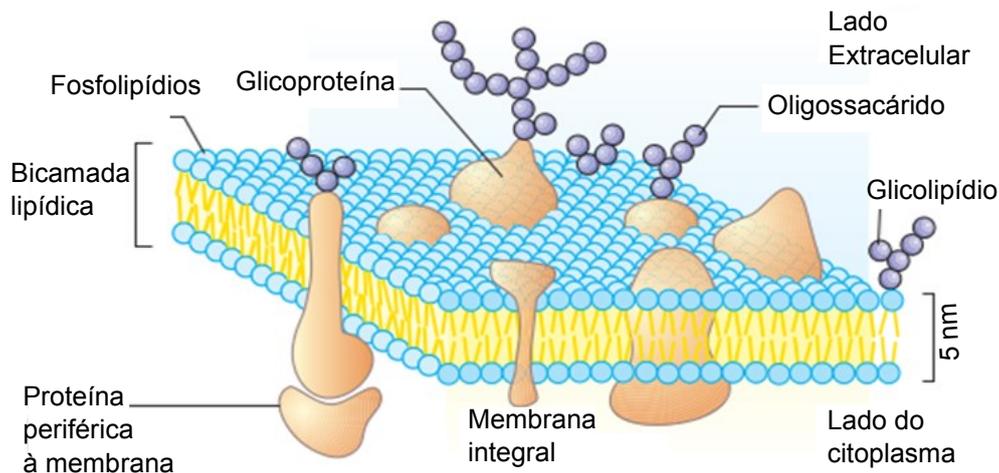
Em relação ao parâmetro de empacotamento crítico, algumas generalizações têm sido feitas para prever intuitivamente a estrutura que será formada pelo tensoativo:

- Moléculas com cabeça relativamente pequena e grandes valores  $\frac{v}{a_0 l_c}$ , formam normalmente bicamadas, grandes vesículas ou micelas inversas.
- Moléculas que contêm cadeias de hidrocarbonetos insaturadas, especialmente com estrutura *cis*, terão pequenos valores de  $l_c$ , tendendo formar grandes vesículas e estruturas invertidas.
- Moléculas com múltiplas cadeias permitem uma grande variedade de movimento, reduzindo o valor efetivo de  $l_c$  e resultando em uma fácil mudança de fase na estrutura do agregado. Esta generalização é importante nas membranas biológicas.

Em sistemas biológicos, as estruturas de maior importância são as vesículas e as bicamadas. Estas estruturas são parte fundamental dos sistemas vivos, incluindo os mais simples.

### 2.2.3. Membranas

A membrana biológica ou membrana plasmática é a estrutura que separa o interior da célula do exterior. Todas as membranas biológicas mantêm um certo padrão, uma bicamada contínua anfifílica, majoritariamente composta de fosfolipídios (LODISH, 2004). A membrana típica é de aproximadamente 5 nm de espessura (KOOLMAN; RÖHM, 2005), onde uma série de proteínas transmembranas estão inseridas. Além disso, muitas membranas têm no exterior da bicamada carboidratos ligados aos lipídios ou proteínas. A proporção e diversidade dos componentes anteriores determinam as propriedades da membrana. Em geral, as membranas são muito heterogêneas, contendo em uma mesma membrana, setores com componentes muito diferentes. Além disso, as membranas não são simétricas em suas camadas, podendo ter camadas externas e internas com propriedades muito diferentes entre elas, e tendo uma composição muito diferente (SCHICK; KURICA; CHACKO, 1976).



**Ilustração 2 Componentes da membrana biológica. Adaptado de Koolman e Röhm(KOOLMAN; RÖHM, 2005).**

Tanto os lipídios como as proteínas e os outros componentes podem se difundir através do plano da membrana celular(SINGER; NICOLSON, 1972). Esta difusão ocorre facilmente, no entanto a difusão entre uma camada e outra é um processo menos favorecido, pois é especialmente difícil para os fosfolípidios e praticamente impossível para as proteínas ocorrer sem utilizar outros mecanismos, diferentes do que uma simples translação de camada. Nos lipídios, a translação entre camadas é assistida por proteínas chamadas flipases.

Os lipídios mais importantes encontrados na membrana celular biológica são fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol e fosfatidilserina(KOOLMAN; RÖHM, 2005).

Em princípio a fluidez da membrana depende dos lipídios. Em geral, ela tem alto conteúdo de lipídios insaturados, dificultando o estado semicristalino e fazendo com que a membrana seja mais fluida. Assim, quanto maior a proporção de lipídios insaturados menor será a temperatura de transição de fase semicristalina. Um lipídio não tensoativos que também aumenta a fluidez da membrana é o colesterol. Em temperaturas baixas, o colesterol aumenta a fluidez da fase semicristalina, mas também estabiliza a fase fluida da membrana(HOFSÄSS; LINDAHL; EDHOLM, 2003).

As membranas animais mais importantes são a membrana plasmática, membrana nuclear interna e externa, o retículo endoplasmático, o aparelho de Golgi e as membranas mitocondriais. Todas estas membranas apresentam

polaridade, fazendo com que as camadas internas e externas apresentem diferentes potenciais elétricos(LODISH, 2004).

#### **2.2.4. Permeabilidade**

Normalmente só compostos pouco polares e de pequeno tamanho cruzam a membrana celular por livre difusão. Portanto, moléculas pequenas como gases, água, amônio e glicerol, por exemplo, podem cruzar a membrana por livre difusão. As maiores moléculas de açúcares não cruzam a membrana no processo de difusão simples(SEYDEL; WIESE, 2002). Outro fator importante que determina a permeabilidade da membrana celular em relação a um composto é a polaridade. Moléculas pouco polares entram na membrana celular, mas as membranas são impermeáveis a compostos muito polares e compostos iônicos. Não obstante, existem outros mecanismos pelos quais estas moléculas podem cruzar a membrana celular. Este tipo de difusão normalmente é assistida por canais ou transportadores(LODISH, 2004).

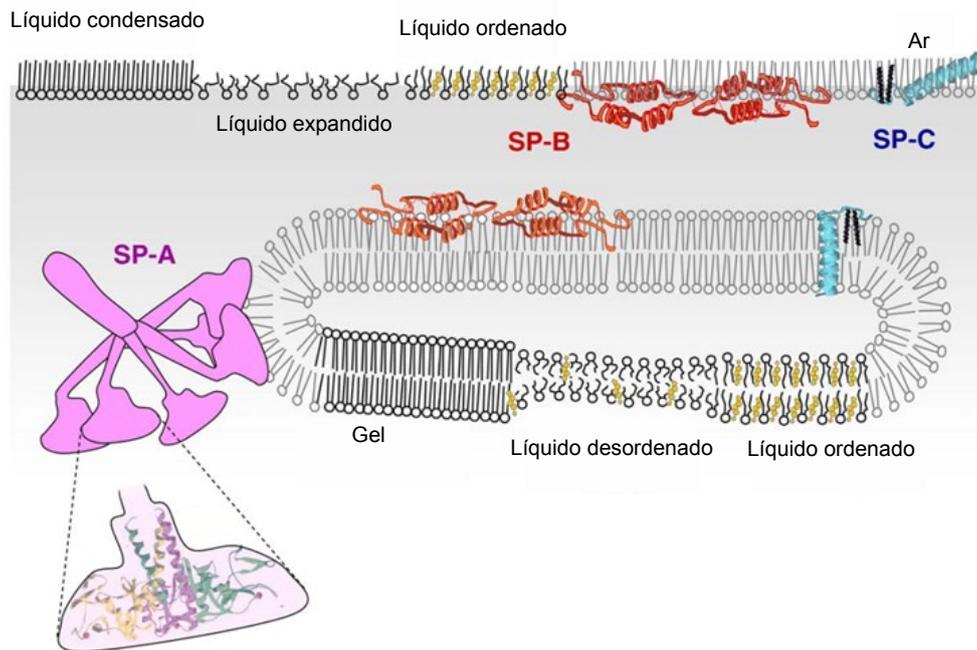
O cruzamento dos compostos pelas fases é determinado por algum gradiente de concentração. A direção do transporte é em direção a fase com menor concentração. No entanto, a membrana deve ser considerada como uma terceira fase e o coeficiente de partição entre a membrana e ambos extremos da membrana devem ser considerados.

#### **2.2.5. Surfactante Pulmonar**

O surfactante pulmonar é uma mistura de lipídios e proteínas que formam a filme na interface de transferência entre o alvéolo pulmonar e o ar. A função principal do surfactante pulmonar é facilitar a respiração(NAG et al., 2005), mas também aumentar a complacência do pulmão, para facilitar o restabelecimento das vias respiratórias colapsadas, e para prevenir o colapso do pulmão (atelectasia).

O surfactante pulmonar consiste principalmente de fosfatidilcolina, com dipalmitoilfosfatidilcolina como o maior componente. Também contém fosfatidilglicerol aniônico, colesterol e outros lipídios. A diferença da membrana celular típica para o surfactante pulmonar é que a primeira contém lipídios saturados e lipídios insaturados quase na mesma medida. Isto proporciona uma maior capacidade de modificar sua estrutura. Existem principalmente quatro proteínas interagindo com o surfactante pulmonar: duas hidrofóbicas, SP-B e

SP-C, associadas principalmente as propriedades tensioativas, e outras duas associadas ao surfactante A (SP-A) e ao surfactante D (SP-D).



**Ilustração 3 Estruturas formadas pelo surfactante pulmonar e pelas proteínas associadas. Adaptado de Pérez-Gil(PÉREZ-GIL, 2008).**

A forma principal do surfactante pulmonar facilitar a respiração é diminuir a tensão superficial da fase aquosa do alvéolo. Os alvéolos são estruturas globulares presentes na superfície interna do pulmão. Os milhões de alvéolos de raios da ordem de 100  $\mu\text{m}$  produz uma área de intercâmbio perto de 70  $\text{m}^2$ . Sem o surfactante pulmonar a tensão interfacial água/ar é da ordem de 70  $\text{mN m}^{-1}$ , que faz com que não ocorra o cobrimento da área total do alvéolo durante o processo de respiração.

O surfactante pulmonar reduz o valor da tensão superficial a valores perto de 0  $\text{mN m}^{-1}$ . No entanto, estes valores são obtidos por compressão e expansão, e é pouco provável que chegue em algum momento ao equilíbrio termodinâmico no processo de respiração. Isto é, são mais influenciados pela dinâmica do surfactante, pois estes valores baixos de tensão superficial são obtidos pelo colapso da monocamada e a coexistência de agregados na subfase. A proteína associada ao surfactante A (SP-A) e a proteína associada ao surfactante D (SP-D) têm um papel muito importante no funcionamento do pulmão.

A teoria mais aceita sobre a dinâmica do surfactante pulmonar durante a respiração propõe que, durante a compressão na expiração, os lipídios são transladados da monocamada para os reservatórios de fosfolípídios. Durante a

expansão na inspiração, os fosfolipídios são reincorporados no surfactante pulmonar. No entanto, existem outros possíveis mecanismos pelos quais o surfactante pulmonar pode chegar a baixos níveis de tensão superficial. Pesquisas recentes indicam que a redistribuição de lipídios não necessariamente resulta em uma diminuição da tensão superficial. Outras pesquisas mostram que tampouco é necessária a utilização de proteínas para chegar a tensões superficiais baixas e as proteínas funcionam mais para intercâmbio de lipídios entre os reservatórios e a monocamada(NAG et al., 2005).

No ser humano adulto o surfactante pulmonar é composto de acordo com a seguinte a percentagem em massa:

- (~80%) Fosfolipídios (FL):
  - 40-60% de fosfatidilcolina (PC), onde a estrutura mais abundante é a dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC)
  - ~20% de fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilinositol (PI) e fosfatidiletanolamina (PE).
- (5-10 %) outros lipídios (principalmente colesterol)
- (5-10%) proteínas tais como SP-A, SP-B, SP-C e SP-D.

#### **2.2.5.1. Surfactante pulmonar artificial**

A obtenção de surfactante pulmonar artificial é de grande interesse no tratamento de doenças ligadas ao pulmão. No entanto, o mecanismo exato pelo qual o surfactante pulmonar chega a níveis baixos de tensão superficial é ainda desconhecido. Em consequência, não se tem desenvolvido um surfactante pulmonar que possa substituir o natural(ZHANG et al., 2011).

No mercado existem duas fontes de surfactante pulmonar artificial: o surfactante pulmonar natural de origem animal e o surfactante pulmonar total ou majoritariamente artificial. Os surfactantes diferem em composição e/ou presença de proteínas e lipídios. Normalmente, a composição determina o uso do surfactante, mas o maior uso do surfactante pulmonar artificial é no tratamento de deficiência respiratória em neonatos(WILLSON; NOTTER, 2011).

Alguns exemplos de surfactante pulmonar comercialmente disponíveis, e sua respectiva composição, são:

Surfactante Natural	Proteínas totais	Fosfolipídios totais	SP-B	SP-C
Survanta	1mg/mL	25 mg/mL, DPPC 50%,PG	0,01 mg/mL	0,99 mg/mL
Infasurf	0,65 mg/mL	35 mg/mL, DPPC 53%	0,26 mg/mL	0,39 mg/mL
Curosurf	1 mg/mL	80 mg/mL, DPPC 35%	0,3 mg/mL	0,7 mg/mL
<b>Surfactante sintético</b>				
Surfaxin	KL4 (SP-B sintética)	DPPC 75%	SP-B sintética, análogo KL4 (0,8mg)	

**Quadro 5 Composição de surfactante natural e sintético adaptado de Bissinger e Carlson(BISSINGER; CARLSON, 2006)**

### 2.2.6. Simulação de Modelos de Membrana Celular e de Surfactante Pulmonar.

Os modelos contêm uma certa variedade de lipídios e proteínas. Esta grande complexidade da membrana biológica dificulta o entendimento de sua dinâmica, estrutura e termodinâmica através de modelos atomísticos. No entanto, simulações moleculares têm revelado a dinâmica, estrutura e mecanismos de interação física de modelos simplificados de modelos de membrana celular(BENNETT; TIELEMAN, 2013). Uma das vantagens do uso de simulações moleculares de membranas é a obtenção da informação da posição e da velocidade de todas as partículas que constituem a membrana durante o tempo total do fenômeno analisado, mas com limitações na escala de tempo.

As simulações moleculares de modelos de membrana celular são tipicamente simulações de dinâmica molecular clássica, em geral de bicamadas de fosfolipídios com ou sem esteróis. Fenômenos como a mobilidade lateral, automontagem do modelo de membrana e transições de fase são amplamente investigadas. Como resultado destas pesquisas, os componentes comuns da membrana celular são bem parametrizados e suas limitações são bem conhecidas, existindo modelos de membrana celular confiáveis.

Usualmente a dinâmica molecular de modelos de membranas enfoca-se na investigação de sua estrutura e nas interações com diversas moléculas e macromoléculas. Comparações diretas com dados experimentais mostram a efetividade e precisão dos modelos de membrana celular(FALLER et al., 2009).

Normalmente o perfil da pressão lateral de uma membrana é definido por

$$-\gamma = \int_{-\infty}^{\infty} dz \pi(z) = \int_{-\infty}^{\infty} dz [P_T(z) - P_N(z)]$$

onde o perfil da pressão lateral através da bicamada é  $\pi(z) = P_T(z) - P_N(z)$ ,  $z$  é a direção normal da bicamada,  $P_N(z)$  é a componente normal do tensor virial da pressão  $\Xi$ , e  $P_T(z)$  é o componente tangencial do tensor de pressão  $\Xi$ . Em dinâmica molecular, o tensor da pressão é calculado, não obstante deve-se ter cuidado na escolha de qual barostato é usado.

### 2.2.6.1.

#### Difusão de compostos e modelos de membrana celular

A permeabilidade de uma molécula através da membrana celular depende principalmente da solubilidade da molécula na fase aquosa e da difusão dentro da membrana. Estes valores podem variar de  $10^2$  a  $10^{-5}$  cm s<sup>-1</sup> (SEYDEL; WIESE, 2002). Em especial, moléculas de massa molecular entre 50 a 300 Daltons (D) dependem da hidrofobicidade e de parâmetros de difusão simples (SEYDEL; WIESE, 2002).

O principal problema das investigações de permeabilidade de moléculas através de membrana celular com metodologias usando dinâmica molecular é a escala de tempo e o nível de amostragem necessário. No entanto, com um número menor de amostras e algumas simplificações, a dinâmica molecular pode ser usada para caracterizar a difusão e/ou o mecanismo de diferentes compostos. E, no caso de sistemas onde as características dos fenômenos em questão não são facilmente acessíveis, como nas análises complexas de sistemas biológicos, a dinâmica molecular de modelos simplificados destes sistemas é uma alternativa bastante razoável.