

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FFCLRP – DEPARTAMENTO DE FÍSICA E MATEMÁTICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA APLICADA À MEDICINA E BIOLOGIA

**“Análogos fluorescentes de agentes anti-parasitários:  
interações com agregados anfílicos”**

MARINA BERARDI

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área: Física Aplicada à Medicina e Biologia.

RIBEIRÃO PRETO - SP

2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FFCLRP – DEPARTAMENTO DE FÍSICA E MATEMÁTICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA APLICADA À MEDICINA E BIOLOGIA

**“Análogos fluorescentes de agentes anti-parasitários:  
interações com agregados anfifílicos”**

MARINA BERARDI

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área: Física Aplicada à Medicina e Biologia.

Orientador: Prof. Dr. Amando Siuiti Ito

RIBEIRÃO PRETO - SP

2010

## FICHA CATALOGRÁFICA

Berardi, Marina.

“Análogos fluorescentes de agentes anti-parasitários: interações com agregados anfifílicos”. Ribeirão Preto, 2010.

139 p.: il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo. Área de concentração: Física Aplicada à Medicina e Biologia.

Orientador: Ito, Amando Siuti.

1. Análogo fluorescente. 2. Miltefosina (hexadecilfosfocolina). 3. Agregados anfifílicos. 4. Leishmaniose. 5. Espectroscopia de fluorescência

*Aos meus pais, pela oportunidade de seguir no caminho que eu escolhi e pelo apoio incondicional, e ao meu namorado André, pelo companheirismo, compreensão e apoio, sempre.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Amando, em primeiro lugar, pela confiança depositada em mim e pela oportunidade oferecida, pela orientação e apoio, e além de tudo pela paciência e compreensão com as minhas limitações pessoais, permitindo que eu concluísse esse trabalho.

À Giusi, professora de italiano, e amiga, pelos jantares e conversas descontraídas.

À Cássia, ex-coleguinha de laboratório, pelas lições e dicas nos experimentos, discussões de resultados durante minha iniciação na ciência, e amiga, pelas aulas de italiano e sessões de terapia gratuitas, além das saídas para comer.

Ao Gustavo Pudimm, amigo e conselheiro, pelas ajudas com o computador, idas à cantina, fofocas inocentes, caminhadas na pista do CEFER e a ajuda na correção e impressão desse trabalho.

Ao Jorge, pelas fofocas e conversas intermináveis e sem conclusão, pelas aulas de “portuñol”, e pelos cafés diários.

Ao Sérgio, pelas risadas e empolgação, e pelo apoio técnico com o computador.

À Ana, pela correção do texto dessa dissertação, a companhia, os papos sem-fim, e pelos passeios sem rumo e sem objetivo.

Ao Danilo, pelas músicas finlandesas e pelas histórias divertidas.

Aos coleguinhas do Grupo de Fotobiofísica, em especial aos alunos e ex-alunos do professor Amando: Wallance, Gabriela, Larissa “Morango”, Ana Paula

Ao professor Iouri e seus alunos: Andrea, Érika, Jefferson, pelas conversas, cafés e almoços no bandex.

Aos companheiros de bandeirão, já citados acima, sem os quais eu não almoçaria todos os dias, sozinha.

À Marina Ness, pela companhia de viagem, as caminhadas sem fim, os lanches do Mc Donald’s, as fotos, a paciência com minha teimosia.

Aos meus tios Paulo e Elza, pelo presente de formatura, a oportunidade de viagem e pelo carinho dedicado.

À Stela e à Maristela, pela amizade e, apesar da distância, o apoio.

À Ivana, pelas confissões e a disposição em me ouvir em qualquer momento.

À minha família, que considero essencial, em especial ao meu avô, pela admiração e carinho, mas principalmente à minha avó, pela ajuda na minha criação e pelo apoio irrestrito.

Aos meus pais, que são meu apoio, meu exemplo, minha força. Sem eles não teria tido a oportunidade de estar escrevendo essa dissertação hoje.

Ao meu irmão, pela brigas sempre terminadas com um abraço e pelos “papos-cabeça” e conselhos nos momentos difíceis.

Ao André, meu eterno namorado, sempre companheiro, amigo, paciente, apoiando os meus sucessos e evitando meus fracassos.

Aos meus sogros (futuros), pelo apoio e pelo carinho.

Aos técnicos Carlão e Adriano pelas dúvidas tiradas na preparação das amostras.

À Ana Paula Ramos, pela colaboração nos experimentos de medida de tensão superficial e na análise de resultados.

À Professora Bete Zaniquelli, pela utilização dos equipamentos do Laboratório de Físico-Química do Departamento de Química da USP em Ribeirão Preto e pelas dicas e discussões dos experimentos e dos resultados.

Ao Professor Ulises Acuña, pelo análogo fluorescente sintetizado e pela conversa e direcionamento dos experimentos.

À Universidade de São Paulo, à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras e, mais diretamente, ao Departamento de Física e Matemática, pela utilização do espaço físico, os funcionários prestativos, os professores.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento da pesquisa e pelo apoio financeiro no período de desenvolvimento do trabalho.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a execução e finalização deste trabalho.

## RESUMO

A leishmaniose é uma doença tropical causada por diferentes espécies do gênero *Leishmania* que atinge boa parte do mundo e, nas duas últimas décadas, sua manifestação visceral (LV) reapareceu de forma preocupante, uma vez que sua letalidade vem aumentando de forma gradativa. Vários medicamentos estão sendo testados, incluindo o análogo lipídico sintético hexadecilfosfolina (miltefosina), que é um agente antitumoral e antileishmania que age nas membranas celulares e pode induzir apoptose. O primeiro local de interação dos análogos de fosfolipídios é a membrana celular e eles apresentam atividade citotóxica não específica em concentrações acima da sua concentração micelar crítica, sendo importante o conhecimento de suas propriedades de agregação em meio aquoso e sua forma de interação com outros agregados presentes no meio. Além disso, derivados fluorescentes da miltefosina permitem o uso de técnicas de fluorescência para a caracterização de sua atividade leishmanicida.

Neste trabalho examinamos propriedades de agregação da miltefosina (MT) e de seu análogo fluorescente MT-BODIPY em meio aquoso, utilizando técnicas baseadas em medidas de tensão superficial e de espectroscopia de fluorescência, tanto estática como com resolução temporal. Os resultados de cmc da miltefosina, a 25°C e com diferentes métodos, foram 60  $\mu\text{M}$  em meio aquoso puro (água Milli Q), 50  $\mu\text{M}$  em tampão fosfato 10 mM (pH 7,4), e 35  $\mu\text{M}$  em tampão fosfato com NaCl 150 mM. Através do estudo de vários parâmetros de fluorescência, verificamos que para a MT-BODIPY, um limite superior para sua cmc é de 10 $\mu\text{M}$ .

Utilizando a sonda fluorescente amino-hexadecil-benzamida (Ahba) estudamos a interação entre a miltefosina e vesículas fosfolipídicas de DMPC e DPPC, analisando os espectros de absorção e emissão fluorescente, a anisotropia estática e os decaimentos da intensidade fluorescente e da anisotropia. O conjunto de resultados mostrou que os efeitos do acréscimo de miltefosina às vesículas, no intervalo de razões molares entre 1:100 e 5:100, não são monitorados pela sonda Ahba, uma sonda localizada na região das cabeças polares. Por outro lado, a análise da fluorescência intrínseca da MT-BODIPY mostrou que seu acréscimo, no mesmo intervalo de razões molares, promove desorganização da bicamada lipídica. Como nesse caso o grupo fluorescente localiza-se no final da cadeia alifática, concluímos que os maiores efeitos da miltefosina sobre as bicamadas ocorrem na região interna das cadeias apolares.

Palavras-chave: Análogos fluorescentes. Miltefosina (hexadecilfosfocolina). Leishmaniose. Agregados anfífilos. Espectroscopia de fluorescência.

## ABSTRACT

Leishmaniasis is a complex of tropical diseases caused by different species of the genus *Leishmania* which reaches almost the whole world, including Brazil, and, on the last decades, its visceral form reappeared with a lot of million people at risk of infection, and the lethality is increasing every year. Several drugs have been used to treat the disease, and miltefosine, a synthetic phospholipid analogue, has been tested and is already used in some countries. This drug is a confirmed antitumor and antileishmanial agent that acts on the cell membranes, which is the first local of interaction of a phospholipid analogue. The cytotoxic activity is not specific on concentrations above its critical micelle concentration, and the knowledge of the aggregation properties of the drug in aqueous medium becomes important, as well as its interaction with aggregates presents in the environment. Fluorescent analogues of miltefosine allow the use of fluorescent techniques to characterize the antileishmanial activity of miltefosine.

In this work we investigate the aggregation properties of the drug miltefosine (MT), and the fluorescent analogue MT-BODIPY in aqueous medium, by using techniques of surface tension measurements and both, steady-state and time-resolved fluorescence spectroscopy. The values of miltefosine cmc at 25°C from different methods were about 60  $\mu\text{M}$  in pure aqueous medium (Milli Q water), 50  $\mu\text{M}$  in phosphate buffer 10 mM (pH 7,4), and 35  $\mu\text{M}$  in phosphate buffer with NaCl 150 mM addition.

The fluorescent probe amine-hexadecyl-benzamide (Ahba) was used to study the interaction of miltefosine with phospholipid vesicles of DMPC and DPPC, from absorption and fluorescent emission spectra, steady-state anisotropy and fluorescence and anisotropy decays. The results have showed that the effects of miltefosine addition in the vesicles, with molar ratios between 1:100 and 5:100, are not monitored by the probe Ahba, which is located on the polar head groups region on the bilayer. On the other hand, analysing the intrinsic fluorescence of the analogue MT-BODIPY, we concluded that when the molecule is added, in the same molar ratio intervals, there is a disorder in the lipidic bilayer. The fluorescent group BODIPY is located on the MT aliphatic tail, therefore, the more accentuated effects of miltefosine in the bilayers occur in the region of the apolar tails.

Keywords: Fluorescent analogues. Miltefosine (hexadecylphosphocholine). Leishmaniasis. Amphiphilic aggregates. Fluorescence spectroscopy.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Fêmea do flebotomíneo adulto, egurgitada. Fonte: [4].	20
Figura 1.2: Formas do parasita <i>Leishmania</i> : (a) flagelada ou promastigota e (b) aflagelada ou amastigota. Fonte: [4].	20
Figura 1.3: Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> . Fonte: [4].	22
Figura 1.4: Distribuição da leishmaniose visceral. Adaptado de: [9].	23
Figura 1.5: Distribuição de casos autóctones de leishmaniose visceral por município do Brasil em 2002. Fonte: SINAN-COVEV/CGDT/DEVEP/SVS/MS [4].	25
Figura 1.6: Letalidade da leishmaniose visceral no Brasil, de 1994 a 2004. Adaptado de: [7].	26
Figura 1.7: Leishmaniose visceral americana: Distribuição de municípios com encontro de vetor (74) e transmissões canina (53) e humana (38). Fonte: SUCEN-SES/SP, CVE-SES/SP. Secretaria de Estado da Saúde/Coordenadoria de Controle de Doenças [18].	27
Figura 1.8: Estibogluconato de sódio.	28
Figura 1.9: Pentamidina.	28
Figura 1.10: Anfotericina B.	28
Figura 1.11: Miltefosina.	28
Figura 1.12: Paromomicina.	28
Figura 1.13: Sitamanquina.	29
Figura 2.1: Estruturas micelares: (a) micelas esféricas aquosas; (b) micela reversa.	36
Figura 2.2: Gráfico esquemático da tensão superficial ( $\gamma$ ), da condutividade específica ( $\kappa$ ) e da turbidez ( $\tau$ ) como função da concentração total de um surfactante típico em solução. A linha pontilhada indica a concentração micelar crítica (cmc). Adaptado de [50].	38
Figura 2.3: Esquema da micelização de um surfactante iônico típico [50].	39
Figura 2.4: Esquema da formação de uma vesícula lipídica ou lipossomo. (a) Molécula de fosfolípido com a cabeça polar solúvel em água e as caudas hidrofóbicas. Com a adição de água, a tendência é de formação de uma (b) bicamada fosfolipídica e posterior formação do (c) lipossomo.	41
Figura 2.5: Diagrama de fase condensada parcial do sistema dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC)-água. Adaptado de [50].	42

Figura 2.6: Etapas da preparação do filme lipídico à hidratação do filme para formação das LMVs [58]. .....	43
Figura 2.7: 1,2-dimiristoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina, o DMPC, com massa molar de 677,933 g/mol, e 1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina, o DPPC, com massa molar de 734,039 g/mol. ....	45
Figura 2.8: Forças de atração entre moléculas na superfície e no interior de um líquido. ....	45
Figura 2.9: Determinação da concentração micelar crítica (cmc) a partir de medidas de tensão superficial em função da concentração de surfactante. ....	47
Figura 2.10: Geometria da gota pendente. Fonte: [63]. ....	49
Figura 2.11: Equipamento da gota pendente. Fonte: [64]. ....	50
Figura 2.12: Exemplo da medida de espalhamento dinâmico de luz de duas amostras: uma de partículas grandes e uma de partículas pequenas, e a intensidade da luz espalhada em função do tempo. ....	51
Figura 2.13: Curvas de potencial em função da separação entre os núcleos e transição vertical obedecendo ao Princípio de Franck-Condon. ....	53
Figura 2.14: Esquema da medida de absorção de luz. ....	54
Figura 2.15: Diagrama de Perrin-Jablonski com os tempos característicos dos processos de excitação eletrônica e emissão e os esquemas dos <i>spins</i> eletrônicos de cada estado de energia. ....	56
Figura 2.16: Molécula da sonda fluorescente Ahba (ácido <i>orto</i> -aminobenzóico-hexadecilamina). Fonte: [48]. ....	58
Figura 2.17: (a) Sonda BODIPY: 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno [46], e (b) com o grupo etil no carbono da posição 6, com comprimento de onda de absorção máximo de 517 nm e de emissão de 546 nm, com rendimento quântico de 0,70 [67]. ....	59
Figura 2.18: O análogo fluorescente da MT, 6Et-BODIPY-11C-PC: 11-(4,4-Difluoro-6-etil-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-2-il) <i>n</i> -undecilfosfatidilcolina, aqui chamado de MT-BODIPY. ....	60
Figura 2.19: Esquema dos momentos de transição de absorção (amarelo) e emissão (vermelho) de um fluoróforo, e sua despolarização entre a excitação e a emissão. ....	60
Figura 2.20: Esquema dos dipolos de absorção e de emissão com um ângulo $\phi$ entre eles para $t=0$ , e representação do ângulo $\omega$ do dipolo de emissão entre a absorção e a emissão. ....	61
Figura 2.21: Esquema do equipamento para medida de anisotropia de fluorescência. ....	61

Figura 2.22: Esquema da polarização da emissão de moléculas grandes e pequenas. ....	63
Figura 2.23: Medidas de tempo de vida no domínio do tempo. Adaptado de: [68]. ....	64
Figura 2.24: Esquema para a medida pelo método TCSPC. Adaptado de: [68]. ....	66
Figura 3.1: Espectrômetro <i>Ultrospec 2100 pro</i> . ....	71
Figura 3.2: Esquema de um equipamento para medida de espectroscopia de fluorescência, em formato L. ....	72
Figura 3.3: Espectrofluorímetro <i>Hitachi F-7000</i> . ....	73
Figura 3.4: Lasers <i>Tsunami</i> e <i>Milennia</i> utilizados nos experimentos de fluorescência com resolução temporal. ....	74
Figura 3.5: Equipamento <i>OCA-20</i> para medida de tensão superficial pelo método da gota pendente [71]. ....	75
Figura 3.6: Exemplo de imagem da gota pendente que é utilizada pelo <i>software</i> para o cálculo da tensão superficial da gota. ....	75
Figura 3.7: Obtenção do raio de curvatura no ápice da gota pendente. Fonte: [63]. ....	76
Figura 3.8: Diagrama esquemático de um equipamento de espalhamento dinâmico de luz de 90° convencional, cujo princípio está na Seção 2.3. ....	77
Figura 4.1: Gráfico da cinética da tensão superficial da MT em diferentes concentrações em tampão fosfato (10 mM) pH 7,4 à $T=25^{\circ}\text{C}$ . ....	80
Figura 4.2: Gráfico da tensão superficial da gota em função da concentração de MT na solução em tampão fosfato (10 mM) pH 7,4 à $T= 25^{\circ}\text{C}$ , com os ajustes lineares da diminuição da tensão superficial e da tensão superficial constante cuja intersecção resulta na cmc. ....	81
Figura 4.3: Gráfico da tensão superficial da gota em função da concentração de milefosina na solução, em escala logarítmica, com destaque para o valor da cmc da MT nos diferentes meios. ....	82
Figura 4.4: Distribuição de tamanhos da solução aquosa de MT obtida por medida de espalhamento dinâmico de luz com etanol do estoque, calculada pelo método automático do <i>software</i> . ....	83
Figura 4.5: Distribuição de tamanhos da solução aquosa de MT obtida por medida de espalhamento dinâmico de luz com etanol do estoque, após filtragem com poros de 220 nm, calculada pelo método automático do <i>software</i> . ....	84
Figura 4.6: Gráfico da distribuição dos diâmetros dos agregados obtida para a solução aquosa de MT 2 mM preparada a partir de um filme de MT, ou seja, sem a presença de	

etanol, após filtragem da solução com poros de 220 nm, calculada pelo método automático do <i>software</i> .....	85
Figura 4.7: Espectro de absorção da sonda fluorescente Ahba 20 $\mu$ M em tampão fosfato 10 mM pH 7,4 à 36°C com acréscimo de MT.....	86
Figura 4.8: Espectros de fluorescência da sonda Ahba com adição de MT, em tampão fosfato 10 mM pH 7,4 com adição de 150 mM de NaCl à 25°C.....	87
Figura 4.9: Picos de intensidade de fluorescência da sonda Ahba com adição de MT, em tampão fosfato 10 mM pH 7,4 com adição de 150 mM de NaCl à 25°C para os comprimentos de onda de 398 nm e 410 nm. ....	88
Figura 4.10: Gráfico da anisotropia de fluorescência da sonda Ahba (20 $\mu$ M) em tampão fosfato (10 mM) pH 7,4 a 25°C em função da concentração de MT na solução. Excitação = 340 nm, Emissão = 400 nm. Média de 5 medidas.....	89
Figura 4.11: Esquema de agregação dos monômeros de Ahba (em cor clara) e MT (em cor escura) em uma solução de Ahba com acréscimo de MT em meio aquoso. ....	89
Figura 4.12: Gráfico da anisotropia de fluorescência da sonda Ahba em função da concentração de MT na solução de tampão fosfato (10 mM) pH 7,4 com adição de 150mM de NaCl a 25°C. ....	90
Figura 4.13: Espectros de fluorescência da sonda Ahba com adição de MT em tampão fosfato 10 mM pH 7,4 a 36°C.....	91
Figura 4.14: Máximo da intensidade de fluorescência em tampão fosfato 10 mM pH 7,4 à 36°C em função da concentração de MT.....	91
Figura 4.15: Gráfico da anisotropia de fluorescência da sonda Ahba em função da concentração de MT na solução de tampão fosfato 10mM pH 7,4 à 36°C. ....	92
Figura 4.16: Espectros de absorção de excitação da sonda fluorescente Ahba 20 $\mu$ M em solução com vesículas de DPPC (1 mM) à 50°C, normalizados.....	93
Figura 4.17: Espectros de fluorescência da sonda Ahba (20 $\mu$ M) em solução tampão fosfato (10 mM) pH 7,4 contendo vesículas de DMPC (1 mM), com acréscimo de alíquotas de miltefosina em temperatura de 36° C. ....	94
Figura 4.18: Espectros de fluorescência da sonda Ahba (20 $\mu$ M) em solução tampão fosfato (10 mM) pH 7,4 contendo vesículas de DPPC (1 mM), com acréscimo de alíquotas de miltefosina em temperatura de 50° C. ....	94
Figura 4.19: Gráfico da razão das intensidades de fluorescência da sonda Ahba (20 $\mu$ M) com acréscimo de alíquotas de MT em relação à ausência de MT em solução contendo vesículas de DMPC e DPPC (1 mM) em temperaturas de 36°C e 50°C, respectivamente. ....	95

Figura 4.20: Gráfico da anisotropia de fluorescência da sonda Ahba (20 $\mu$ M) em função da concentração de MT em solução contendo vesículas de DMPC e DPPC (1 mM) em temperaturas de 36°C e 50°C, respectivamente.....	96
Figura 4.21: Decaimento da fluorescência da sonda Ahba (20 $\mu$ M) em solução contendo vesículas de DPPC (1 mM) em temperatura de 50°C com acréscimo de alíquotas de MT.....	97
Figura 4.22: Ajuste exponencial do decaimento da fluorescência da sonda Ahba (20 $\mu$ M) solução contendo vesículas de DPPC (1 mM) em temperatura de 50°C com acréscimo de 10 $\mu$ M de MT.....	97
Figura 4.23: Decaimento da anisotropia de fluorescência da sonda Ahba (20 $\mu$ M) em solução contendo vesículas de DPPC (1 mM) em temperatura de 50°C, ajuste da curva e resíduos. ....	99
Figura 4.24: Decaimento da anisotropia de fluorescência da sonda Ahba (20 $\mu$ M) em solução contendo vesículas de DPPC (1 mM) em temperatura de 50°C com acréscimo de 50 $\mu$ M de MT, ajuste da curva e resíduos.....	99
Figura 4.25: Espectros de absorção do análogo MT-BODIPY com aumento da concentração em etanol à 25°C.....	101
Figura 4.26: Máximo dos valores de absorbância do análogo MT-BODIPY em 502 e 529 nm em função da concentração em etanol à 25°C.....	101
Figura 4.27: Razão entre os valores de absorbância do análogo MT-BODIPY em 502 e 529 nm em função da concentração em etanol à 25°C.....	102
Figura 4.28: Espectros de absorção do análogo MT-BODIPY com aumento da concentração em tampão fosfato 10 mM pH 7,4 à 25°C.....	103
Figura 4.29: Máximo dos valores de absorbância do análogo MT-BODIPY em 502 e 529 nm em função da concentração em tampão fosfato 10 mM pH 7,4 à 25°C. ....	103
Figura 4.30: Razão entre os valores de absorbância do análogo MT-BODIPY em 502 e 529 nm em função da concentração em tampão fosfato 10 mM pH 7,4 à 25°C. ....	104
Figura 4.31: Razão entre os valores de absorbância do análogo MT-BODIPY em 502 e 529 nm em função da concentração, em tampão fosfato 10 mM pH 7,4 e em etanol, à 25°C. ....	105
Figura 4.32: Espectros de fluorescência do análogo MT-BODIPY 10 $\mu$ M em etanol à 25°C para diferentes comprimentos de onda de excitação. ....	106
Figura 4.33: Espectros de fluorescência do análogo MT-BODIPY com excitação em 330 nm com aumento da concentração em etanol à 25°C.....	107
Figura 4.34: Máximo das intensidades de fluorescência do análogo MT-BODIPY em 542 e 551 nm em função da concentração em etanol à 25°C.....	108

Figura 4.35: Espectros de fluorescência do análogo MT-BODIPY 10 $\mu$ M em tampão fosfato 10 mM pH 7,4 à 25°C para diferentes comprimentos de onda de excitação.....	109
Figura 4.36: Espectros de fluorescência do análogo MT-BODIPY com excitação em 510 nm com aumento da concentração em tampão fosfato 10 mM pH 7,4 à 25°C. ....	109
Figura 4.37: Máximo das intensidades de fluorescência do análogo MT-BODIPY em 537 e 566 nm em função da concentração em tampão fosfato 10 mM pH 7,4 à 25°C. ....	110
Figura 4.38: Razão entre os valores de intensidade de fluorescência do análogo MT-BODIPY em 537 e 566 nm em função da concentração em tampão fosfato 10 mM pH 7,4 à 25°C.....	110
Figura 4.39: Razão entre os valores de intensidade de fluorescência do análogo MT-BODIPY em 537 e 566 nm em função da concentração em tampão fosfato 10 mM pH 7,4 à 25°C.....	111
Figura 4.40: Gráfico da anisotropia de fluorescência do análogo MT-BODIPY em função da concentração em etanol à 25°C. ....	112
Figura 4.41: Gráfico da anisotropia de fluorescência do análogo MT-BODIPY em função da concentração em tampão fosfato 10 mM pH 7,4 à 25°C.....	112
Figura 4.42: Decaimento da intensidade de fluorescência do análogo MT-BODIPY em concentração de 10 $\mu$ M em etanol à 25°C com emissão em 537 nm. ....	113
Figura 4.43: Decaimento da intensidade de fluorescência do análogo MT-BODIPY em concentração de 10 $\mu$ M em tampão fosfato 10 mM pH 7,4 à 25°C, e resposta do instrumento em 505 e 510 nm. ....	113
Figura 4.44: Decaimento da intensidade de fluorescência do análogo MT-BODIPY em concentração de 10 $\mu$ M em tampão fosfato 10 mM pH 7,4 à 25°C, para as diferentes combinações dos polarizadores de excitação e emissão.....	115
Figura 4.45: Decaimento da anisotropia de fluorescência do análogo MT-BODIPY em concentração de 10 $\mu$ M em tampão fosfato 10 mM pH 7,4 à 25°C.....	115
Figura 4.46: Espectros de absorção do análogo fluorescente MT-BODIPY com aumento da concentração em solução com vesículas de DMPC 1 mM à 36°C.....	117
Figura 4.47: Máximo da absorbância do análogo fluorescente MT-BODIPY em 502 e 533 nm com aumento da concentração em solução com vesículas de DMPC 1 mM à 36°C. ....	118
Figura 4.48: Razão entre as absorbâncias do análogo fluorescente MT-BODIPY em 502 e 533 nm em função da concentração em solução com vesículas de DMPC 1 mM à 36°C.....	118
Figura 4.49: Espectros de absorção do análogo fluorescente MT-BODIPY com aumento da concentração em solução com vesículas de DPPC 1 mM à 50°C.....	119

Figura 4.50: Espectros de excitação do análogo MT-BODIPY com emissão em 540 nm em solução com vesículas de DPPC 1 mM à 50°C.....	120
Figura 4.51: Comparação entre os espectros de absorção do análogo MT-BODIPY 10 $\mu$ M nos diferentes meios. ....	120
Figura 4.52: Espectros de fluorescência do análogo MT-BODIPY 10 $\mu$ M para diferentes comprimentos de onda de excitação em solução com vesículas de DMPC 1 mM à 36°C.....	121
Figura 4.53: Espectros de fluorescência do análogo MT-BODIPY com excitação em 480 nm em solução com vesículas de DMPC 1 mM à 36°C.....	121
Figura 4.54: Máximos de intensidade de fluorescência do análogo MT-BODIPY, em 547 e 562 nm, com excitação em 480 nm em solução com vesículas de DMPC 1 mM à 36°C.....	122
Figura 4.55: Espectros de fluorescência do análogo MT-BODIPY com excitação em 505 nm em solução com vesículas de DPPC 1 mM à 50°C.....	123
Figura 4.56: Máximos de intensidade de fluorescência do análogo MT-BODIPY, em 542 e 556 nm, com excitação em 505 nm em solução com vesículas de DPPC 1 mM à 50°C.....	123
Figura 4.57: Comparação entre os espectros de fluorescência do análogo MT-BODIPY 10 $\mu$ M nos diferentes meios. ....	124
Figura 4.58: Anisotropia de fluorescência do análogo MT-BODIPY com o aumento da concentração em solução com vesículas de DMPC 1 mM à 36°C no intervalo de comprimentos de onda de 547 à 563 nm. ....	125
Figura 4.59: Anisotropia de fluorescência do análogo MT-BODIPY com o aumento da concentração em solução com vesículas de DPPC 1 mM à 50°C no intervalo de comprimentos de onda de 542 à 555 nm. ....	125
Figura 4.60: Comparação da anisotropia de fluorescência do análogo MT-BODIPY com o aumento da concentração nos diferentes meios.....	126
Figura 4.61: Decaimento da intensidade de fluorescência do análogo MT-BODIPY com o aumento da concentração em solução com vesículas de DPPC 1 mM à 50°C. ...	126
Figura 4.62: Tempo de correlação rotacional $\theta$ obtido a partir dos ajustes de decaimento da anisotropia de fluorescência do análogo MT-BODIPY em função da concentração em solução com vesículas de DPPC (1 mM) em temperatura de 50°C. ....	128

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Taxonomia do gênero <i>Leishmania</i> . Adaptado de: [3]. .....	22
Tabela 1.2: Os processos de descobrimento e desenvolvimento de medicamentos com uma breve definição de cada etapa. Os processos são mais complexos que os apresentados, e programas adicionais tais como a ampliação e o processo químico, análises estatísticas tal qual a preparação de arquivos são partes importantes do processo [31]. .....	30
Tabela 4.1: Tempos de vida $\tau$ obtidos a partir do ajuste mono-exponencial do decaimento da sonda Ahba (20 $\mu$ M) em tampão fosfato (10 mM) pH 7,4, contendo vesículas de DPPC (1 mM), com o acréscimo de MT em temperatura de 50°C. Os ajustes foram obtidos no <i>software</i> fornecido pela <i>Edinburgh Instruments</i> . .....	98
Tabela 4.2: Resultados do ajuste de decaimento da intensidade de fluorescência: tempos de vida ( $\tau_i$ ), fatores pré-exponenciais ( $I_i$ ) e contribuição percentual da componente de tempo longo ( $\%_{(1)}$ ) para o decaimento de MT-BODIPY em etanol e em tampão fosfato pH 7,4 em temperatura de 25°C, excitação em 330 nm e 505 nm, respectivamente, e emissão 537 nm. Os ajustes foram obtidos no <i>software</i> fornecido pela <i>Edinburgh Instruments</i> . .....	114
Tabela 4.3: Resultados do ajuste de decaimento da anisotropia de fluorescência: tempos de correlação rotacional ( $\theta$ ), anisotropia de tempo zero ( $A_0$ ) e anisotropia em tempo infinito ( $A_\infty$ ) do análogo MT-BODIPY em tampão fosfato pH 7,4 em temperatura de 25°C, excitação em 330 nm e 505 nm, respectivamente, e emissão 537 nm. Os ajustes foram obtidos no <i>software</i> fornecido pela <i>Edinburgh Instruments</i> . Os valores de chi-quadrado reduzido variaram entre 0,968 e 1,067. ....	116
Tabela 4.4: Coeficiente de absorção molar $\epsilon$ calculado em cada um dos meios estudados (tampão, etanol, suspensão de vesículas de DMPC) no ombro (502 nm) e no pico de absorção (529, 529 e 533 nm, respectivamente). .....	119
Tabela 4.5: Parâmetros do ajuste do decaimento da fluorescência do MT-BODIPY para as diferentes concentrações em solução contendo vesículas de DPPC (1 mM) em temperatura de 50°C. ....	127
Tabela 4.6: Parâmetros do ajuste do decaimento da anisotropia de fluorescência do MT-BODIPY para as diferentes concentrações em solução contendo vesículas de DPPC (1 mM) em temperatura de 50°C. ....	128

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xvi</b>
<b>CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
1.1 A Leishmaniose .....	19
1.2 Tratamentos .....	27
1.3 Objetivos do Trabalho .....	33
<b>CAPÍTULO 2. ASPECTOS TEÓRICOS .....</b>	<b>35</b>
2.1 Sistemas Microheterogêneos .....	35
2.1.1 Micelas .....	36
2.1.2 A Concentração Micelar Crítica (cmc).....	37
2.1.3 Vesículas.....	40
2.2 Tensão Superficial .....	45
2.2.1 Método da Gota Pendente.....	48
2.3 Espalhamento Dinâmico de Luz .....	50
2.4 Espectroscopia de Transições Eletrônicas .....	52
2.4.1 Absorção .....	52
2.4.2 Fluorescência .....	55
2.4.3 Sondas Fluorescentes.....	58
2.4.4 Anisotropia de Fluorescência .....	60
2.4.5 Tempo de Vida .....	63
2.4.6 Decaimento da Anisotropia .....	67
<b>CAPÍTULO 3. METODOLOGIA .....</b>	<b>69</b>
3.1 Condições Experimentais .....	69
3.2 Materiais .....	69
3.3 Preparação das Vesículas de Lipídios.....	70
3.4 Medidas de Espectroscopia de Absorção.....	71
3.5 Medidas de Espectroscopia de Fluorescência.....	71
3.5.1 Tempo de Decaimento da Fluorescência.....	73
3.6 Medida de Tensão Superficial: Método da Gota Pendente.....	75
3.7 Medida de Tamanho de Partículas: Espalhamento Dinâmico de Luz .....	77
<b>CAPÍTULO 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>78</b>
4.1 Agregação da Miltefosina (MT) .....	78
4.1.1 Medidas de Tensão Superficial .....	79

4.1.2	Tamanho dos Agregados em Solução Aquosa .....	83
4.2	Espectroscopia da Sonda Ahba com Adição de MT.....	86
4.2.1	Absorção .....	86
4.2.2	Fluorescência .....	87
4.2.3	Anisotropia de Fluorescência de Estado Estacionário.....	88
4.2.4	Efeitos de Temperatura.....	91
4.2.5	Ahba e Interação da MT com Sistemas com Vesículas.....	92
4.3	Agregação do Análogo Fluorescente MT-BODIPY.....	100
4.3.1	Espectros de Absorção.....	100
4.3.2	Espectros de Fluorescência.....	106
4.3.3	Anisotropia de Fluorescência em Estado Estacionário.....	111
4.3.4	Decaimento da Fluorescência e da Anisotropia .....	113
4.3.5	Interação do Análogo MT-BODIPY com Vesículas.....	116

## **CAPÍTULO 5. CONCLUSÕES .....** 129

5.1	Tensão Superficial e Espalhamento .....	129
5.2	Fluorescência em Sistemas com MT e Ahba.....	130
5.3	Análogo Fluorescente MT-BODIPY .....	131

## **REFERÊNCIAS .....** 133

## CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 A Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença designada pela Organização Mundial da Saúde (em inglês *World Health Organization*, WHO) como negligenciada, termo usado para doenças, principalmente em países em desenvolvimento, para as quais não há medicamentos eficientes, acessíveis ou fáceis de aplicar. As doenças tropicais negligenciadas (sigla em inglês, NTD) são uma consequência da pobreza. Os mais afetados são as populações mais pobres, geralmente vivendo em áreas rurais afastadas, favelas urbanas ou em zonas de conflito. As NTDs não têm prioridade nas políticas de saúde pública. Embora clinicamente diversas, as NTDs apresentam condições comuns que lhes permitem persistir em condições de pobreza, onde elas se agrupam e frequentemente se sobrepõem. Mais de 1 bilhão de pessoas – um sexto da população mundial – sofrem de uma ou mais NTDs [1].

O investimento das indústrias farmacêuticas na produção de medicamentos para as NTDs é muito baixo, sendo justificado pelas mesmas pelo baixo retorno financeiro, já que essas doenças atingem, em sua maioria, a população de baixa renda dos países em desenvolvimento, exigindo a produção de medicamentos de baixo custo.

As NTDs são um grupo de infecções parasíticas, bacterianas, e algumas virais e fúngicas, crônicas, debilitantes, que promovem a pobreza, e estão entre as causas mais comuns de enfermidades das pessoas mais pobres que vivem em países em desenvolvimento. Aproximadamente 40% das 556 milhões de pessoas estimadas que vivem na América Latina e no Caribe (LAC) vivem abaixo da linha de pobreza, incluindo 47 milhões de pessoas que vivem com menos de US\$ 1 por dia, e outros 74 milhões que vivem com menos de US\$ 2 por dia. Em termos da distribuição de renda, a LAC exibe a maior desigualdade, com um décimo mais rico da população com 48% da renda total e um décimo mais pobre com somente 1,6%. Dois terços dos pobres da região vivem em favelas, assentamentos, bairros periféricos, ou seja, em comunidade urbanas e peri-urbanas onde a pobreza se combina com as condições de água contaminada, saneamento pobre, e proliferação de reservatórios de roedores e vetores. Na região da LAC, há 62.000 pessoas infectadas com a leishmaniose cutânea em 18 países, com maior vulnerabilidade das pessoas que habitam em favelas e áreas rurais pobres, e 5.000 pessoas infectadas com a leishmaniose visceral. Desses casos, 28.375 de LC e 3.386 de LV

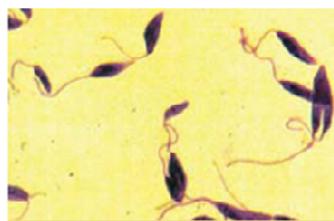
são no Brasil Os fatores mais relevantes na emergência da leishmaniose cutânea zoonótica (sigla em inglês, ZCL) e da leishmaniose visceral zoonótica (sigla em inglês, ZVL) no novo mundo são a pobreza, a urbanização, a migração humana. Aproximadamente 62.000 novos casos de ZCL ocorrem principalmente no Brasil, Colômbia, Paraguai, Venezuela, Panamá, Equador, e Peru [2].

*Leishmania spp.* são parasitas protozoários que necessitam essencialmente de dois hospedeiros obrigatórios diferentes para completar seu ciclo de vida biológico: um inseto vetor invertebrado (Figura 1.1), geralmente fêmeas de mosquitos *Phlebotomus*, no Velho Mundo, ou *Lutzomyia*, no Novo Mundo, e um hospedeiro definitivo, o homem, o cão, ou até mesmo um vertebrado selvagem [3].

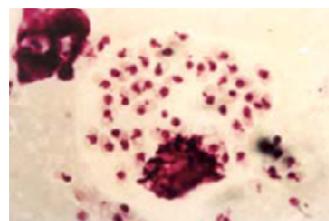


**Figura 1.1:** Fêmea do flebotomíneo adulto, egurgitada. Fonte: [4].

Os parasitas *Leishmania* existem em duas formas que são morfologicamente e bioquimicamente diferentes. A forma dos insetos, chamada de promastigota (Figura 1.2a), é dotada de mobilidade e tem um corpo fusiforme. Os amastigotas aflagelados (Figura 1.2b) têm formato esférico [3].



(a)



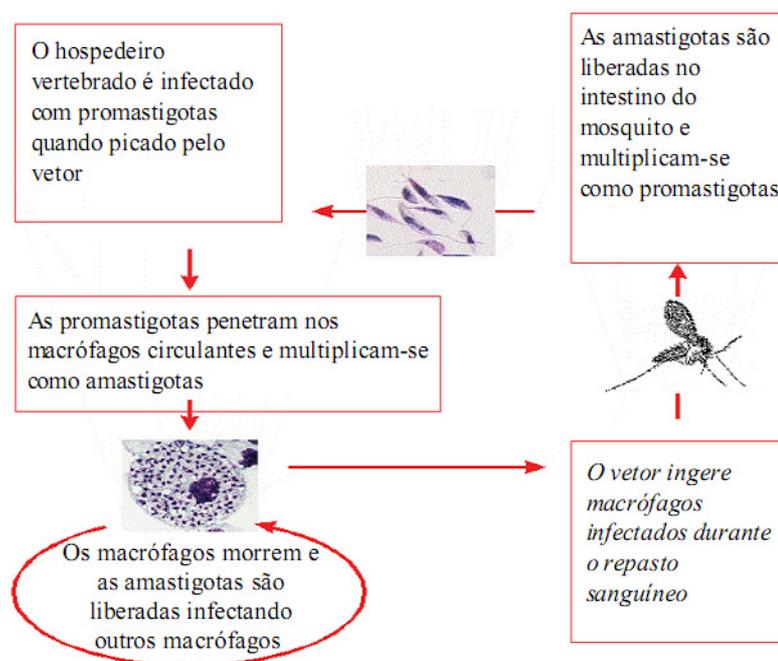
(b)

**Figura 1.2:** Formas do parasita *Leishmania*: (a) flagelada ou promastigota e (b) aflagelada ou amastigota. Fonte: [4].

A infecção se inicia quando um mosquito se alimenta do sangue de um hospedeiro infectado (por exemplo, cães, marsupiais, edentados, roedores). Pequenas quantidades de sangue, linfa e macrófagos infectados com amastigotas de *Leishmania* são ingeridos. Uma vez

ingeridos, os amastigotas migram para o intestino médio do mosquito, onde se transformam em promastigotas por fissão binária [3].

Depois de um período de quatro a cinco dias, promastigotas se movem em direção ao esôfago e às glândulas salivares do inseto. O ciclo do parasita no inseto se completa em torno de 72 horas [4]. Os mosquitos infectados, durante a segunda alimentação de sangue, regurgitam promastigotas infecciosas da sua faringe na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado. Uma vez na corrente sanguínea, promastigotas são fagocitados pelas células fagocíticas mononucleares do hospedeiro. Depois da fagocitose, a transformação para a divisão em amastigotas ocorre dentro de 24h. A interação entre *Leishmania* e macrófagos desempenha um papel central na patogênese da infecção. A iniciação da infecção está relacionada à habilidade do parasita em se ligar e entrar na célula hospedeira. Uma vez que um amastigota se estabeleceu e replicou dentro da célula hospedeira, o próximo passo é ele e seus descendentes se espalharem para outros macrófagos. Dado o pequeno número de parasitas inoculados durante a transmissão natural (uma média de 1000) a propagação dos amastigotas para macrófagos não infectados é crucial para o desenvolvimento da doença. A “fase silenciosa” que segue a infecção está associada à interação de um grupo distinto de moléculas do parasita consistindo de determinantes invasivas que estabelecem a infecção mas não ativam efeitos ou mecanismos imunes. Os parasitas devem, portanto, se espalhar para as células não infectadas sem causar uma resposta imune [5]. Enfim, as células hospedeiras sofrem lise, liberando os parasitas, que se espalham para novas células e tecidos de diferentes órgãos (principalmente baço, fígado e medula óssea) causando lesões e destruição do tecido [3]. As infecções causadas podem se limitar à pele ou se espalhar para os órgãos internos. O ciclo de vida da *Leishmania* está ilustrado na Figura 1.3.



**Figura 1.3:** Ciclo de vida da *Leishmania*. Fonte: [4].

As leishmanioses são consideradas principalmente como uma zoonose, podendo acometer o homem, quando este entra em contato com o ciclo de transmissão do parasita, transformando-se em uma antroponose. Atualmente, encontra-se entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo (TDR/WHO) [4].

Há diferentes espécies do protozoário *Leishmania* (Tabela 1.1), algumas das quais causam a doença no Brasil [6].

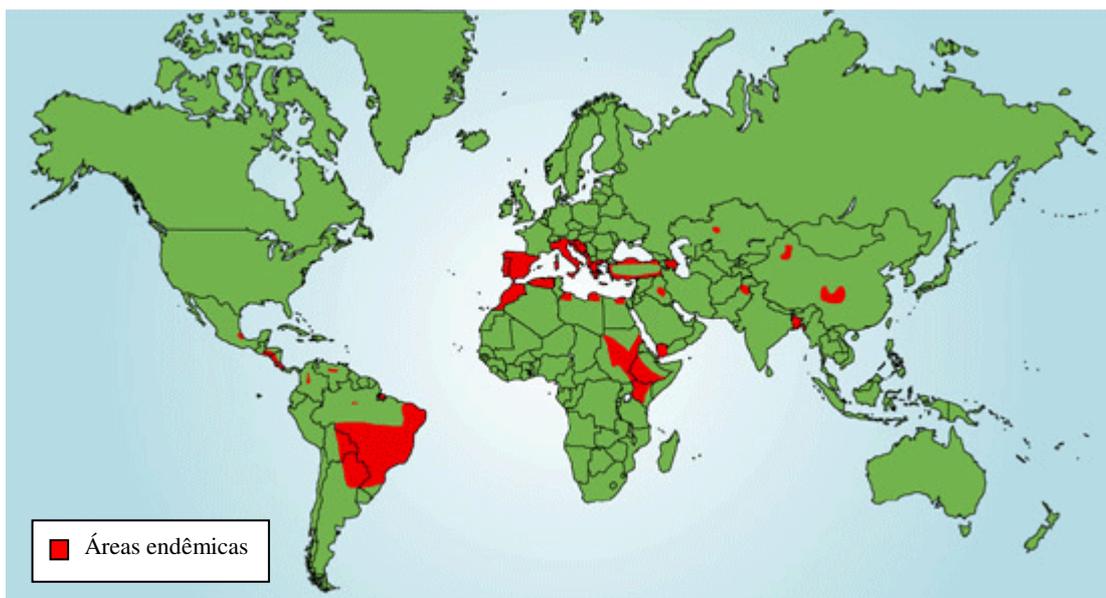
**Tabela 1.1:** Taxonomia do gênero *Leishmania*. Adaptado de: [3].

Gênero	<i>Leishmania</i>							
Subgênero	<i>Leishmania</i>					<i>Viannia</i>		
Complexos	<i>L. donovani</i>	<i>L. major</i>	<i>L. tropica</i>	<i>L. mexicana</i>	<i>L. aethiopica</i>	<i>L. lainsoni</i>	<i>L. brasiliensis</i>	<i>L. guyanensis</i>
Espécies	<i>L. donovani</i>			<i>L. mexicana</i>				
	<i>L. chagasi</i>		<i>L. tropica</i>	<i>L. amazonensis</i>			<i>L. brasiliensis</i>	<i>L. guyanensis</i>
	<i>L. infantum</i>	<i>L. major</i>	<i>L. killicki</i>	<i>L. garhansi</i>			<i>L. peruviana</i>	<i>L. panamensis</i>
	<i>L. archibaldi</i>			<i>L. pifanoi</i>				
				<i>L. venezuelensis</i>				

A doença pode apresentar três diferentes formas clínicas, sendo elas a leishmaniose visceral (LV), que é fatal se não tratada, a cutânea (LC) e a mucocutânea (LM) [6].

O parasita protozoário *Leishmania donovani* é o agente causador da leishmaniose visceral (LV), comumente conhecida como calazar, e é transmitido para o homem por mosquitos *Phlebotomus* infectados. No Novo Mundo, a *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* é a

espécie comumente isolada em pacientes com LV [4]. As complicações infecciosas e as hemorragias são os principais fatores de risco para a morte na LV [7]. As áreas endêmicas de LV no mundo estão em destaque no mapa ilustrado na **Erro! Fonte de referência não encontrada.** A maioria dos casos de LV ocorre em apenas seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal e Sudão [8].



**Figura 1.4:** Distribuição da leishmaniose visceral. Adaptado de: [9].

A leishmaniose cutânea (LC) é endêmica no Novo Mundo, desde a fronteira dos EUA com o México, atravessando a América Central e a parte norte da América do Sul, e chegando até o Rio de Janeiro. A doença pode ser causada por diversas espécies de *Leishmania*: membros do subgênero *L. vianna* tais como *L. v. panamensis*, *L. v. braziliensis* e *L. v. guayanensis*; e membros do complexo *L. mexicana* tais como *L. m. amazonensis* and *L. m. mexicana* [10]. A leishmaniose mucosal é uma seqüela da leishmaniose cutânea em aproximadamente 1% a 5% das infecções por espécies *Leishmania* do Novo Mundo, tais como *Leishmania braziliensis* [11].

A leishmaniose atinge boa parte do mundo, afetando 88 países, sendo 72 países em desenvolvimento e 13 deles estão entre os menos desenvolvidos. Mais especificamente a LV ocorre em 65 países. São diagnosticados 0,5 milhão de novos casos de LV por ano. [12]. A maioria (90%) desses casos de LV ocorrem em áreas pobres rurais e suburbanas de 5 países: Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil. Noventa por cento dos casos de LC ocorrem em 7 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria [13].

Essa doença constitui um problema de saúde pública mundial que afeta mais de 12 milhões de pessoas [14], havendo ainda 350 milhões de pessoas que vivem com risco de infecção [6]. Ainda não há nenhuma vacina aprovada para uso clínico.

Em 1936, a leishmaniose foi encontrada em quase todos os estados do norte e nordeste do Brasil. Nenhuma incidência epidêmica da infecção foi encontrada em qualquer dos focos, mas a doença existia endemicamente com casos esparsos. Nenhum caso foi observado em cidades. Espécies de *Phlebotomus* eram encontradas regularmente em todos os focos. A incidência da doença, de acordo com a idade, era de 51% em crianças de menos de 6 anos, 17,4% em crianças de 6 à 10 anos e 29,9% em pessoas acima de 10 anos. O tratamento dos casos clínicos com derivados de antimônio foi mostrado eficiente [15].

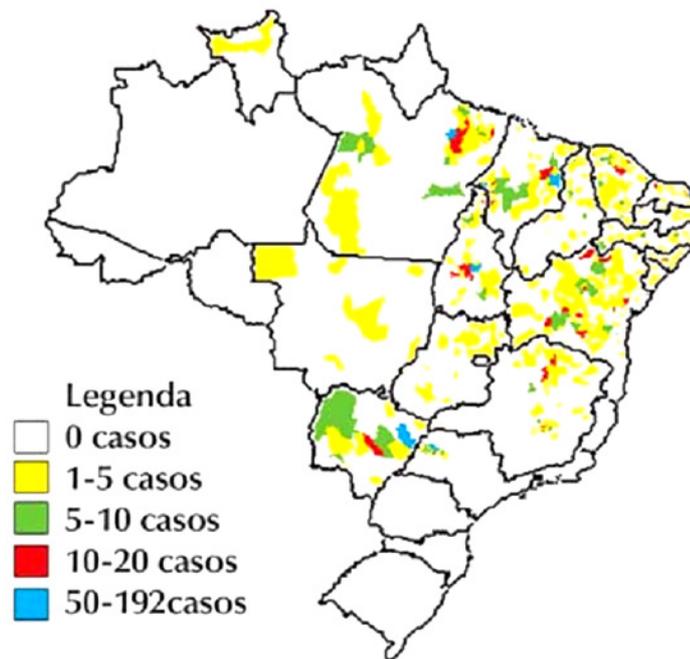
A América Latina e a região do Caribe têm muitas áreas de pobreza, e sofrem com a endemia das doenças tropicais negligenciadas (NTDs). Há uma desproporcionalidade na concentração dessas condições entre os pobres vivendo no Brasil [16].

Segundo o Banco Mundial (em inglês, *World Bank*) 22% da população da América Latina e do Caribe vivem com menos de US\$ 2 por dia, e a mesma porcentagem da população do Brasil está nessa situação. O índice de Gini, uma medida da desigualdade da distribuição de renda e riqueza, é de 0,59 no Brasil, uma das maiores disparidades entre as pessoas ricas e pobres. Aproximadamente 40 milhões de brasileiros que vivem com menos de US\$ 2 por dia são um terço de todas as pessoas pobres que vivem na América Latina e na região caribenha, mas eles sofrem desproporcionalmente das NTDs. A maioria das NTDs na LAC ocorrem no Brasil, incluindo a leishmaniose visceral. Em 2004, o número estimado de casos da doença no Brasil foi de 3.386, correspondendo a 67% da importância da doença na América Latina.

Na América Latina, a doença já foi descrita em pelo menos 12 países, sendo que 90% dos casos ocorrem no Brasil, especialmente na Região Nordeste. O registro do primeiro caso da doença no Brasil ocorreu em 1913, em um paciente oriundo de Boa Esperança, Mato Grosso. A partir de um estudo realizado para o diagnóstico e distribuição da febre amarela no Brasil, encontraram-se 41 casos positivos para *Leishmania* em indivíduos oriundos das regiões Norte e Nordeste. A seguir, o *Lutzomyia longipalpis* foi indiciado como espécie vetora e foram descobertos os primeiros casos da infecção em cães [4].

Desde então, a transmissão da doença vem sendo descrita em vários municípios de todas as regiões do Brasil, exceto na Região Sul (Figura 1.5). A doença tem apresentado mudanças importantes no padrão de transmissão, inicialmente predominado pelas características de ambientes rurais e periurbanos e, mais recentemente, em centros urbanos.

No ano de 2003 a LV foi registrada em 19 das 27 Unidades da Federação, com aproximadamente 1.600 municípios apresentando transmissão autóctone. No Brasil, a LV inicialmente tinha um caráter eminentemente rural e, mais recentemente, vem se expandindo para as áreas urbanas de médio e grande porte, sendo também conhecida por Calazar e barriga d'água [4].



**Figura 1.5:** Distribuição de casos autóctones de leishmaniose visceral por município do Brasil em 2002. Fonte: SINAN-COVEV/CGDT/DEVEP/SVS/MS [4].

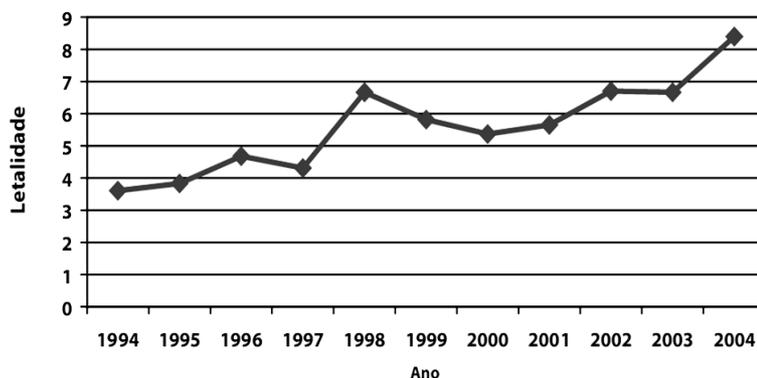
No nordeste do Brasil, a ZVL, causada pelo *L. chagasi*, se tornou uma infecção importante nas favelas de Fortaleza, Salvador, e outros centros urbanos, incluindo o Rio de Janeiro e Belo Horizonte. O Brasil contribui para o maior fardo de NTDs nas Américas, e apesar de o Brasil ser o maior país na LAC, seu fardo de NTDs é desproporcionalmente alto. Além das altas taxas de ancilostomose e esquistossomose, o Brasil também tem o maior número de casos de leishmaniose, leprose e leptospirose [2].

Segundo o Ministério da Saúde, em 19 anos de notificação (1984-2002), os casos de LVA (leishmaniose visceral americana) somaram 48.455 casos, sendo que aproximadamente 66% deles ocorreram nos estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí. Nos últimos dez anos, a média anual de casos no país foi de 3.156 casos, e a incidência de 2 casos/100.000 habitantes [4].

Os vetores da leishmaniose visceral, os flebotomíneos, são conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros. No Brasil, duas espécies estão

relacionadas com a transmissão da doença, *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*. A primeira espécie é considerada a principal espécie transmissora da *L. (L.) chagasi* no Brasil e *L. cruzi* foi apontada como vetor no Estado de Mato Grosso do Sul. No Brasil, a distribuição geográfica de *L. longipalpis* é ampla e parece estar em expansão. Esta espécie é encontrada em quatro das cinco macrorregiões do Brasil: Nordeste, Norte, Sudeste e Centro-Oeste.

Nas duas últimas décadas, a leishmaniose visceral (LV) reapareceu no mundo de forma preocupante. No Brasil, epidemias urbanas foram observadas em várias cidades e a doença tem sido encontrada como uma infecção oportunista em pacientes com AIDS, semelhante ao que se observa no sul da Europa. Além disso, a expansão da epidemia, acometendo grupos de indivíduos jovens ou com co-morbidades, tem provocado um número elevado de óbitos. Observa-se que, nos últimos anos, a letalidade da LV vem aumentando gradativamente, passando de 3,6% no ano de 1994 para 6,7% em 2003, o que representa um incremento de 85%. A análise parcial dos dados, em novembro de 2004, demonstrou aumento de 26% na letalidade desta doença, como está mostrado no gráfico da Figura 1.6 [7].

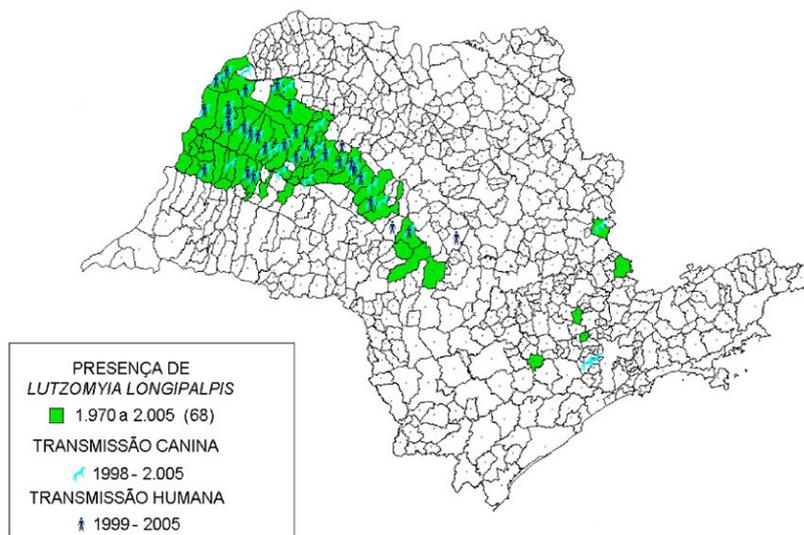


**Figura 1.6:** Letalidade da leishmaniose visceral no Brasil, de 1994 a 2004. Adaptado de:[7].

A leishmaniose é uma doença infecciosa reemergente que representa um desafio de saúde pública no estado de São Paulo [7].

No Estado de São Paulo, com importantes diferenças de distribuição regional, encontram-se sob vigilância a leishmaniose tegumentar e a leishmaniose visceral americana (LVA) [17]. A LVA é uma doença emergente no estado de São Paulo em processo de expansão, detectada pela primeira vez no final da década de 1990, a partir da região de Araçatuba. Atualmente, a doença vem ocorrendo nas regiões de Presidente Prudente, Bauru, Marília e, mais recentemente, na Região Metropolitana de São Paulo e São João da Boa Vista (880 casos confirmados entre 1999 e 2006), perfazendo um total de 55 municípios com transmissão da LVA canina e destes 38 com transmissão em seres humanos. Desde 1997, a

Sucen (Superintendência de Controle de Endemias) já identificou o vetor em 74 municípios receptivos para a ocorrência da doença e 343 municípios deverão ser monitorados quanto à receptividade, como pode ser observado no mapa da Figura 1.7. A partir de novembro de 2004, o estado passou a adquirir a anfotericina B lipossomal para tratamento de casos em crianças e adultos acima de 50 anos, acarretando redução na letalidade pela doença.



**Figura 1.7:** Leishmaniose visceral americana: Distribuição de municípios com encontro de vetor (74) e transmissões canina (53) e humana (38). Fonte: SUCEN-SES/SP, CVE-SES/SP. Secretaria de Estado da Saúde/Coordenadoria de Controle de Doenças [17].

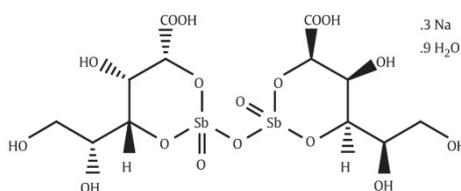
## 1.2 Tratamentos

Atualmente, há desafios na quimioterapia do calazar, tais como (a) resistência generalizada aos antimônios, (b) medicamentos seguros e com baixo custo-benefício com menos toxicidade, (c) co-infecção HIV *Leishmania* e sua incidência crescente e (d) a indisponibilidade de vacinas efetivas.

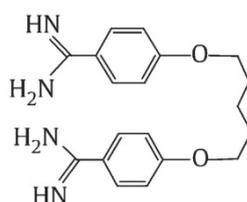
O TDR (*Research and Training in Tropical Diseases*) é um programa especial da WHO para desenvolver, testar e registrar medicamentos para o tratamento das doenças parasitárias tropicais negligenciadas. Trabalha com doenças parasitárias que atingem a população pobre para as quais as companhias não têm incentivo para desenvolver medicamentos [18].

O estibogluconato de sódio (*Sodium Stibogluconate*, SSG) (Figura 1.8) foi considerado o tratamento padrão para a LV. Mas, devido ao aumento da falta de resposta a esse medicamento, vários outros medicamentos foram e ainda estão sendo testados. A pentamidina

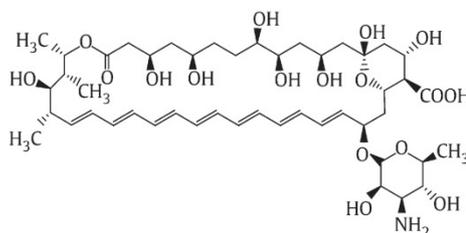
(*pentamidine*) (Figura 1.9) é bastante tóxica e foi recentemente descartada. A anfotericina B (*Amphotericin B*) (Figura 1.10) e suas formulações lipídicas são muito efetivas, mas requerem internação hospitalar e monitoramento. Medicamentos orais como a miltefosina (*Miltefosine*) (Figura 1.11) já foram lançados. Um aminoglicosídeo, a paromomicina (*paromomycin*) (Figura 1.12), e outro medicamento oral, a sitamaquina (*sitamaquine*) (Figura 1.13), estão em desenvolvimento [3, 19].



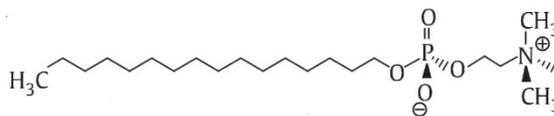
**Figura 1.8:** Estibogluconato de sódio.



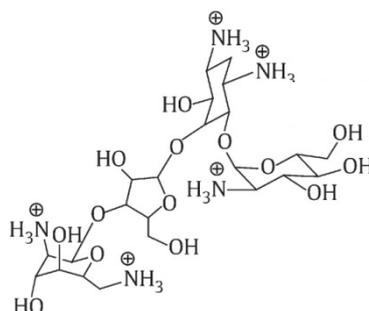
**Figura 1.9:** Pentamidina.



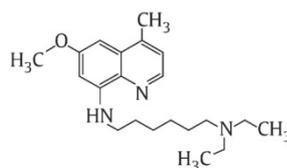
**Figura 1.10:** Anfotericina B.



**Figura 1.11:** Miltefosina.



**Figura 1.12:** Paromomicina.



**Figura 1.13:** Sitamanquina.

O primeiro empreendimento em que o TDR se envolveu no campo da leishmaniose foi com a anfotericina B lipossomal. Após o registro de sucesso europeu da droga em 1994, o TDR organizou ensaios com variação de dose na Índia, no Quênia e no Brasil que definiram os regimes ótimos. Provou-se que esse medicamento é seguro e efetivo para o tratamento da leishmaniose visceral em dosagens diferentes nas zonas endêmicas. Entretanto, ela não é conveniente para o uso em larga escala nos países endêmicos porque um preço acessível não pode ser negociado e por causa da sua via de administração endovenosa. Portanto ainda se está à procura de um medicamento oral com eficácia comparável e um preço mais razoável [18].

No Brasil, os antimoniais pentavalentes são as drogas escolhidas para o tratamento da LV devido à sua comprovada eficácia terapêutica. A anfotericina B é a única opção para o tratamento de gestantes e é indicada como segunda opção para os pacientes que tenham contra-indicações ou tenham apresentado toxicidade ou refratariedade relacionadas ao uso dos antimoniais pentavalentes [4]. Por muito tempo, o tratamento da leishmaniose foi baseado em sais contendo antimônio, como antimoniato de meglumina ou estibogluconato de sódio [20]. O antimônio pentavalente é o tratamento convencional, sendo aplicado por via endovenosa ou intramuscular [7], no entanto, a resistência da infecção visceral na Índia tem gerado novas abordagens de tratamento – anfotericina B e suas formulações lipídicas, paromomicina injetável, e miltefosina oral [21].

A anfotericina B é a droga leishmanicida mais potente disponível comercialmente, atuando nas formas promastigota e amastigota, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Foi demonstrado que doses menores do medicamento podem ser utilizadas sem prejuízo da eficácia com consequente diminuição de sua toxicidade [7, 22]. Atualmente, duas formulações de anfotericina B são disponibilizadas pelo Ministério da Saúde: o desoxicolato de anfotericina B e a anfotericina B lipossomal, ambas aplicadas via infusão venosa, com eficácias comparáveis, sendo que esta última apresenta menor toxicidade. A anfotericina B lipossomal tem custo elevado, o que pode dificultar o seu uso em saúde pública [7].

O descobrimento e o desenvolvimento da miltefosina para o tratamento da leishmaniose traz um novo grupo de drogas anti-protozoário. A miltefosina não é a alquilfosfocolina (APC) ou alquilglicerofosfocolina (APG) mais ativa, mas apresenta excelente bioavaliabilidade [23].

O análogo lipídico sintético hexadecilfosfocolina é um agente antitumoral e antileishmania que age nas membranas celulares e pode induzir apoptose [24] e a observação da resistência em larga escala ao antimônio no tratamento da leishmaniose visceral (LV) no norte de Bihar, na Índia, tem estimulado o desenvolvimento da miltefosina como uma terapia alternativa [25].

Os alvos moleculares e bioquímicos e os mecanismos de ação da miltefosina têm sido extensivamente estudados em células tumorais, mas ainda não foram determinados em protozoários. Em estudos comparativos entre os estágios extracelular e intracelular, é importante considerar: a concentração efetiva da droga nos macrófagos ou outras células hospedeiras pode ser maior ou menor que fora da célula; a taxa de divisão dos estágios difere, e as diferentes temperaturas utilizadas nos ensaios. A independência do sistema imune na ação da droga é importante na aplicação em indivíduos imuno-deficientes. O primeiro local de interação dos análogos de fosfolipídios é a membrana celular, tanto nas células cancerígenas quanto nos protozoários. Até agora os análogos de fosfolipídios mostraram uma clara toxicidade seletiva contra *Leishmania* e *T. cruzi* [26].

O conhecimento dos mecanismos de ação e resistência envolvidos pode permitir o desenvolvimento de novos medicamentos que minimizem ou driblem a resistência ou pode identificar novos alvos para o desenvolvimento de medicamentos [27]. Verificações de base científica dos modos de ação dos análogos lisofosfolipídicos contra os parasitas tripanossomátides podem ajudar a elucidar os mecanismos e estratégias de resistência [28].

**Tabela 1.2:** Os processos de descobrimento e desenvolvimento de medicamentos com uma breve definição de cada etapa. Os processos são mais complexos que os apresentados, e programas adicionais tais como a ampliação e o processo químico, análises estatísticas tal qual a preparação de arquivos são partes importantes do processo. Adaptado de [29].

Nível	Estágio	Atividade
Descobrimeto	Identificação e validação do alvo	Encontrar e analisar um alvo ou processo protéico que pode afetar a doença se perturbado
	Desenvolvimento dos testes	Desenvolver um método para encontrar o que perturba/inibe o alvo
	HTS ( <i>High-throughput screening</i> )	Testar um conjunto de moléculas para encontrar aquelas que têm atividade
	Condução dos testes	Executar testes posteriores com as moléculas selecionadas e iniciar a otimização
	Otimização	Otimizar as moléculas para uma atividade farmacêutica relevante
	Pré-clínico	Testar as moléculas em modelos animais

---

	Fase I	Determinar a segurança e a dosagem do medicamento em humanos
<b>Desenvolvimento</b>	Fase II	Obter provas da eficácia do medicamento em humanos
	Fase III	Caracterizar a droga extensivamente em larga escala em ensaios em humanos
	Registro	Criar uma nova aplicação do medicamento com as autoridades regulatórias

---

A indústria farmacêutica Zentaris (formalmente Asta Medica) desenvolveu e lançou a miltefosina em vários países europeus e no Brasil em 1997, como um tratamento para câncer de mama. A partir de janeiro de 2002, ensaios clínicos de fase III (Tabela 1.2) para o tratamento da leishmaniose estão em andamento [30].

Foi feita uma associação entre a Asta Medica e o TDR, e apesar dos problemas durante o processo de desenvolvimento, a miltefosina está registrada, agora, para o tratamento da leishmaniose visceral na Índia, Alemanha e Colômbia [31].

O desenvolvimento e o registro da miltefosina como uma droga antileishmania representam um triunfo do esforço colaborativo envolvendo uma companhia de medicamentos comercial, pesquisadores clínicos independentes, um governo nacional e o TDR. Possivelmente, a miltefosina pode ser usada sem monitoramento laboratorial, e os pacientes podem ser tratados em casa ou em um ambulatório [18].

A miltefosina causa morte dependente da dose da *L. infantum* com características compatíveis com apoptose, incluindo encolhimento da célula, fragmentação do DNA, e externalização de fosfatidilserina com preservação da integridade da membrana plasmática [32]. Embora poucos dados estejam disponíveis sobre o mecanismo de ação da miltefosina, descobriu-se recentemente que essa droga mata o parasita por processo de apoptose em promastigotas de *L. donovani* [33]. Esses resultados foram confirmados em amastigotas [34]. O caminho apoptótico na *Leishmania* não é bem conhecido.

Imagina-se que o alvo primário dos alquilfosfolipídios (sigla em inglês, APL) é a membrana plasmática por causa da sua similaridade com os componentes da membrana lipídica. Dados os relatos contraditórios sobre a sua ação, o mecanismo exato de ação em nível molecular não é conhecido [35].

A atividade *in vivo* dos análogos lisofosfolipídios (sigla em inglês, LPA) resulta de efeitos diretos em suas células alvo e não depende de um sistema imune funcional. Por causa da sua natureza química, os LPAs têm um potencial para interação com uma variedade de estruturas subcelulares e vias bioquímicas. Apesar de haver muito menos informação disponível em parasitas tripanossomátides, a inibição da biossíntese de fosfatidilcolina (FC) pelos LPAs tem sido documentada. A maior atividade das LPAs como inibidores da biossíntese de FC em parasitas que em células de mamíferos, provavelmente devido às

diferentes vias bioquímicas envolvidas nos dois tipos de células, pode explicar sua ação antiparasita *in vivo*. Devido a natureza química e as propriedades físico-químicas da miltefosina, ela pode agir por interação com várias estruturas subcelulares e enzimas, mas resultados de estudos independentes mostram que a interação ocorre com poucos alvos [36].

Devido à natureza anfífilica das LPAs, elas naturalmente têm uma atividade citotóxica não específica em concentrações iguais ou acima da sua concentração micelar crítica (cmc, da ordem de 10  $\mu\text{M}$  para LPAs farmacologicamente ativos) [37]. Por isso se torna importante o conhecimento de suas propriedades de agregação em meio aquoso e sua forma de interação com outros agregados presentes no meio [38].

Análogos fluorescentes de drogas são ferramentas muito úteis para desvendar seu mecanismo de ação e seus alvos terapêuticos [39]. Estudos recentes com análogos fluorescentes da miltefosina (MT) mostraram que sua concentração dentro dos parasitas era de 1,7 mM, um valor 100 vezes maior que a concentração externa. Esses resultados validam a utilização de tais análogos para o estudo da ação da MT. A partir do uso do análogo fluorescente, pode-se estudar a afinidade, a localização dos receptores e a interação droga-receptor. Esse análogo fluorescente deve ter afinidade e seletividade com o alvo terapêutico como a droga mãe. Esses análogos têm o grupo fosfocolina intacto, o qual é essencial para o efeito leishmanicida *in vivo*. Um estudo foi feito para dois análogos, a feniltridecatetraenilfosfocolina (PTE-MT) e a feniltrideca-trien-inil-fosfocolina (PTRI-MT) [40].

Os derivados fluorescentes da miltefosina permitem o uso de técnicas de fluorescência para a caracterização de sua atividade leishmanicida. Esses análogos fluorescentes da droga podem ser úteis na determinação da distribuição e na localização de receptores intracelulares [41, 42], através de várias técnicas de microscopia de células vivas baseadas em fluorescência, que podem produzir imagens da molécula emissora em células e tecidos com alta resolução espacial e temporal [43]. É igualmente importante entender o mecanismo de ação da miltefosina a partir do estudo das interações de um análogo fluorescente dessa droga, o 6-Et-BODIPY-11C-PC (11-(4,4-difluoro-6-etil-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-2-il)*n*-undecil-fosfatidilcolina) [44] (MT-BODIPY), com agregados anfífilicos, utilizando técnicas de espectroscopia de fluorescência tanto de estado estacionário como resolvida no tempo.

### 1.3 Objetivos do Trabalho

O objetivo principal do trabalho é o estudo de aspectos físico-químicos relacionados às propriedades de agregação da droga leishmanicida miltefosina e sua interação com membranas modelo (vesículas de fosfolipíos). A aplicação farmacológica dos compostos depende do conhecimento detalhado de suas propriedades físico-químicas em ambiente que mimetize o meio em que exerce sua ação biológica. Para isso é importante controlar parâmetros como pH, temperatura, força iônica e outros, que devem ser similares aos encontrados nas células onde a *Leishmania* fica inserida.

Para isso foram feitos experimentos analisando a influência do aumento da concentração da droga, da temperatura e da força iônica do meio. Além disso, foi analisada a interação da miltefosina e de seu análogo fluorescente com vesículas de fosfolipídios, as quais são modelos simplificados de membranas biológicas.

Primeiramente foram feitas medidas em meio aquoso com o objetivo de obter a concentração de miltefosina a partir da qual ocorre a formação de agregados (cmc), já que os valores encontrados na literatura, obtidos por métodos diversos e diferentes dos utilizados nesse trabalho, são bastante divergentes (de 2 a 160  $\mu\text{M}$ ). Também foram estudadas a influência da temperatura e da força iônica nesse valor. Os experimentos foram baseados em medidas de tensão superficial pelo método da gota pendente e em medidas de anisotropia de fluorescência.

Para estudar a interação da miltefosina com membranas lipídicas, foram feitas medidas com a presença de vesículas de DMPC e DPPC, observando a influência da droga nesses modelos lipídicos de membrana. Membranas modelo provaram ser muito úteis na obtenção de informações detalhadas de muitas propriedades físicas e funcionais de membranas [45]. Muitos compostos têm sido desenvolvidos para monitorar micelas e bicamadas lipídicas por métodos de fluorescência. Neste trabalho utilizamos o composto 2-amino-N-hexadecilbenzamida (Ahba), que foi sintetizado recentemente e foi caracterizado como uma sonda fluorescente apropriada para estudos de propriedades de micelas e vesículas [46].

Também foram realizados experimentos para estudar as propriedades espectroscópicas do análogo fluorescente da miltefosina, o MT-BODIPY, em meio aquoso, para observar a auto-agregação do composto, além de experimentos em presença de vesículas de fosfolipídios permitindo uma interpretação das propriedades dinâmicas do sistema através de medidas de anisotropia de fluorescência.

A partir dos resultados do nosso trabalho pode-se ter uma base de como ocorrem as interações e quais os fatores relevantes na interpretação da ação da miltefosina contra a leishmaniose, além de perspectivas para experimentos futuros.

Em seguida a esta introdução, apresentaremos, no capítulo 2, aspectos teóricos envolvidos nos experimentos, relacionados à formação de agregados anfifílicos, às medidas de tensão superficial e ao fenômeno de fluorescência. No capítulo 3 apresentaremos a metodologia utilizada nos experimentos, envolvendo as espectroscopias de absorção, de fluorescência, tanto de estado estacionário como resolvida no tempo, as medidas de tensão superficial pelo método da gota pendente e de espalhamento dinâmico de luz. No capítulo 4 serão apresentados e discutidos os resultados dos experimentos. Finalmente, no capítulo 5 serão apresentadas as conclusões, baseadas nos capítulos anteriores.

## CAPÍTULO 2. ASPECTOS TEÓRICOS

Para o desenvolvimento do trabalho é importante conhecer os princípios físicos dos sistemas estudados assim como dos equipamentos utilizados nos experimentos. O capítulo também é dedicado à teoria envolvida na interpretação dos resultados obtidos no trabalho, os quais serão discutidos no Capítulo 4.

### 2.1 Sistemas Microheterogêneos

As pontes de hidrogênio entre as moléculas de água fornecem as forças coesivas, as quais tornam a água um líquido à temperatura ambiente, e favorecem um rígido ordenamento das moléculas que é típico do gelo. As moléculas polares dissolvem-se facilmente na água porque podem substituir as interações água-água por interações água-soluto, mais favoráveis energeticamente. As biomoléculas não-polares interferem nas interações água-água, mas são incapazes de formar interações água-soluto, conseqüentemente moléculas não-polares são pouco solúveis em água, tendendo a se agregar [47].

Os compostos não polares, hidrofóbicos, provocam mudanças na estrutura da água energeticamente desfavoráveis. Tais compostos interferem nas pontes de hidrogênio formadas entre as moléculas de água, mas não como os solutos polares ou carregados, que interferem apenas na sua vizinhança imediata e compensam essa perda com interações entre água e soluto.

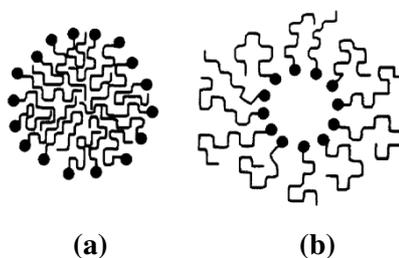
Os compostos anfipáticos possuem regiões apolares e polares ou carregadas. Ao se misturar com a água, a região polar tende a se dissolver devido à interação favorável com o solvente, enquanto a região apolar evita o contato com a água, ocorrendo agregação entre essas regiões das moléculas de soluto para diminuir a área hidrofóbica em contato com a água, enquanto as regiões polares maximizam sua interação com o solvente. Assim se formam as micelas, estruturas estáveis de compostos anfipáticos em água, contendo de centenas a milhares de moléculas de soluto. Não há uma interação intrínseca entre as regiões não-polares, mas um arranjo para que o sistema atinja maior estabilidade termodinâmica ordenando o mínimo de moléculas de água em sua vizinhança.

Em termos de estrutura química, as moléculas anfipáticas têm grupos hidrofóbicos alquila, acila ou aromáticos em combinação com grupos polares ou ionizantes com caráter hidrofílico. É necessário conciliar essas características conflitantes e minimizar a energia do

sistema dando origem à formação de várias estruturas complexas envolvendo o agrupamento dos resíduos hidrofóbicos na fase do interior da solução para formar estruturas agregadas tais como micelas, e que levam a fenômenos de interface como a formação de monocamadas, bicamadas, e estruturas vesiculares relacionadas e a existência da membrana biológica [48]. Muitas biomoléculas são anfipáticas, incluindo proteínas e os fosfolipídios de membrana. As interações hidrofóbicas entre lipídios e entre lipídios e proteínas são determinantes na estrutura das membranas biológicas.

### 2.1.1 Micelas

Surfactantes são moléculas anfifílicas compostas de um grupo polar ligado a uma estrutura hidrofóbica, normalmente uma longa cadeia hidrocarbônica, e são classificados como aniônicos, catiônicos, ou não-iônicos, dependendo da natureza da cabeça polar. Micelas formadas por surfactantes são estruturas dinâmicas apresentando um processo complexo de formação-desagregação. A cinética da micelização na fase aquosa tem sido discutida com base no modelo de Aniansson-Wall [49]. Aspecto mais relevante desse modelo é a previsão de dois tempos de relaxação bem distintos. Experimentos indicam que o tempo de residência de uma micela em um dado número de agregação é da ordem de 0,2 - 10  $\mu$ s, enquanto o tempo de vida médio de uma micela está na escala de tempo de milisegundos. Como a janela de tempo normalmente utilizada em experimentos de fluorescência resolvida no tempo não excede poucos microsegundos, as micelas podem ser consideradas como agregados congelados, ou em alguns casos agregados sujeitos a flutuações no número de monômeros e, portanto, no volume micelar de uma pequena porcentagem do valor do tamanho médio [50].



**Figura 2.1:** Estruturas micelares: (a) micelas esféricas aquosas; (b) micela reversa.

A formação de micelas pode diminuir a energia interfacial de uma solução de substâncias tenso-ativas. Duas forças opostas determinam a estrutura e as características das

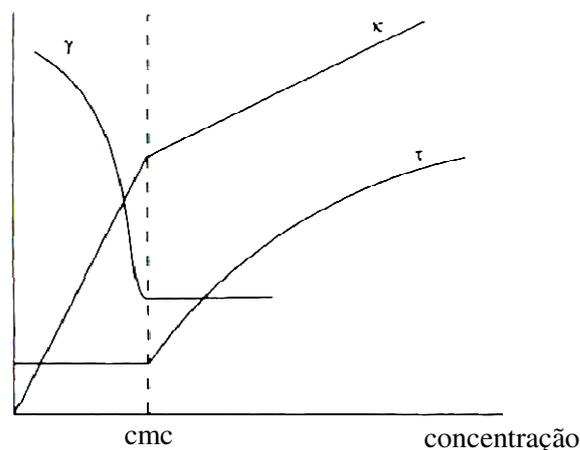
micelas: uma é a interação hidrofóbica atrativa entre as cadeias hidrocarbônicas; a outra é a repulsão entre os grupos da cabeça. A agitação térmica, e principalmente a repulsão eletrostática entre os grupos polares na superfície da micela de surfactantes iônicos se opõem à tendência de agregação. Um parâmetro importante no processo de micelização é a cmc (concentração micelar crítica), que é definida como a concentração de surfactante a partir da qual se inicia a formação de agregados micelares em solução. O valor da cmc é menor com o aumento da parte hidrofóbica da molécula do tenso-ativo, a diminuição da temperatura ou a adição de sais simples [51].

A força repulsiva é óbvia em anfifílicos que possuem grupos da cabeça com uma carga líquida. Entretanto, há também o efeito da solvatação, que desempenha papel principal nos grupos da cabeça neutros. As finas camadas de solvatação em torno dos grupos da cabeça impedem a aproximação desses grupos [52].

Substâncias tenso-ativas não-iônicas formam micelas em concentrações muito baixas. As micelas apresentam um tamanho fixo definido, dependendo da natureza da parte polar do tenso-ativo. Para as micelas esféricas, espera-se um raio ligeiramente inferior ao comprimento das unidades constituintes, pois as cadeias carbônicas podem estar consideravelmente encurvadas, o que é comprovado por medidas do raio das micelas por difusão e espalhamento de luz.

### **2.1.2 A Concentração Micelar Crítica (cmc)**

Os surfactantes sintéticos, devido à sua natureza anfipática, formam agregados ou micelas quando em solução aquosa. A formação de micelas ocorre em um intervalo muito estreito de concentrações de surfactante. Esse processo é caracterizado por alterações abruptas em várias propriedades da solução como a tensão superficial, a condutividade e a turbidez ou espalhamento de luz (Figura 2.2).



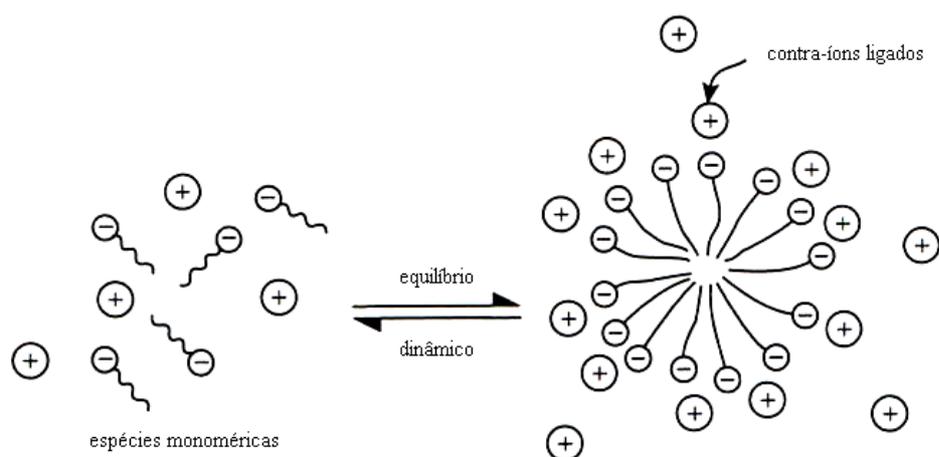
**Figura 2.2:** Gráfico esquemático da tensão superficial ( $\gamma$ ), da condutividade específica ( $\kappa$ ) e da turbidez ( $\tau$ ) como função da concentração total de um surfactante típico em solução. A linha pontilhada indica a concentração micelar crítica (cmc). Adaptado de [48].

A cmc é definida pelas variações abruptas nessas curvas e é definida como o ponto onde se inicia a formação das micelas em solução. Esse valor pode diferir dependendo da natureza da técnica física utilizada para determiná-lo. Isso porque diferentes técnicas físicas respondem diferentemente às espécies monoméricas e micelares na solução. Mas essas diferenças normalmente não são grandes.

Para a determinação dos valores de cmc da miltefosina, foram utilizados dois métodos, um por medidas de tensão superficial e o outro por medidas de anisotropia fluorescência. Para o primeiro, foi utilizado o método da gota pendente, e para o segundo foi utilizada a espectroscopia de fluorescência de estado estacionário.

A ordem de grandeza da cmc de um surfactante é determinada por sua estrutura química e pela composição e temperatura do solvente. A relação entre a estrutura química do surfactante e sua cmc é devido ao balanço hidrofóbico-hidrofílico da molécula. O aumento da hidrofobicidade ou a diminuição da hidrofilicidade provoca um aumento na tendência de micelização. Para surfactantes iônicos com cadeias *n*-alquila, a cmc diminui com o aumento da cadeia, devido ao aumento da hidrofobicidade e conseqüente aumento da micelização. A adição de sais inertes para aumentar a força iônica da solução diminui a cmc de um surfactante iônico.

Na cmc, os agregados de monômeros nas estruturas micelares estão em equilíbrio com uma concentração aproximadamente constante de monômeros livres (Figura 2.3). Quando mais monômeros anfifílicos são adicionados, a quantidade de anfifílicos na fase micelar aumenta, enquanto a concentração de monômeros livres aumenta muito lentamente [52].



**Figura 2.3:** Esquema da micelização de um surfactante iônico típico [48].

As micelas contêm um grande número de monômeros, que depende, entre outros fatores, do comprimento da cadeia hidrocarbônica. O tamanho das micelas está relacionado com o número de monômeros por micela, ou seja, o número de agregação ( $N$ ).

Em baixas concentrações logo acima da  $cmc$ , se formam micelas esféricas menores com uma distribuição estreita de pesos moleculares, e a distribuição é aproximadamente monodispersa. Com o aumento da concentração de sais, e conseqüente diminuição da  $cmc$ , são formadas micelas maiores, levando a distribuições mais polidispersas. Além disso, o aumento da concentração total de surfactante acima da  $cmc$  forma micelas maiores e mais polidispersas. Nas vizinhanças da  $cmc$  em baixas concentrações de sal, micelas de surfactantes catiônicos, aniônicos ou não-iônicos se aproximam de esferas, mas com a adição de sal ou aumento da concentração total de surfactante as micelas se tornam assimétricas.

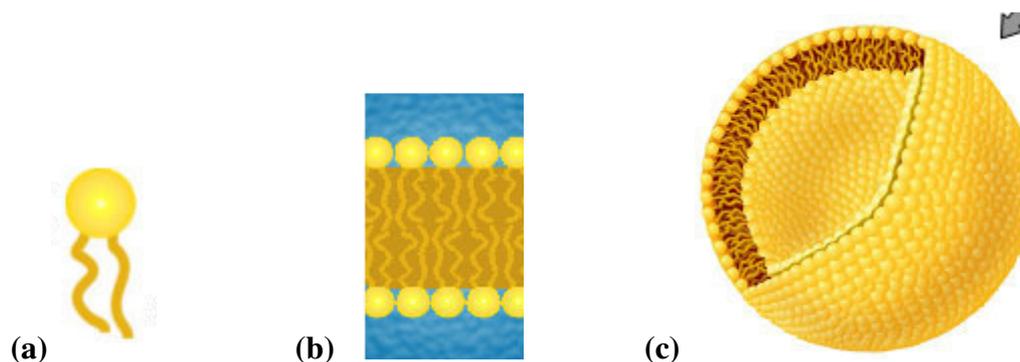
Sais diminuem drasticamente a  $cmc$  de surfactantes carregados, porque eles reduzem a repulsão entre os grupos da cabeça, portanto auxiliando a formação de micelas em menores concentrações de monômeros. A ausência de interações de carga faz com que o efeito de sais na  $cmc$  em surfactantes não-iônicos seja menos pronunciado. Surfactantes zwitteriônicos são eletricamente neutros, mas as cargas que eles possuem no grupo da cabeça influenciam na sua hidrofilicidade e fazem com que as suas propriedades estejam entre as dos surfactantes iônicos e dos não-iônicos [53].

### 2.1.3 Vesículas

As membranas biológicas têm uma estrutura geral comum: um filme muito fino de moléculas de lipídios e de proteínas, mantidas juntas principalmente por interações não-covalentes. As moléculas lipídicas são arranjadas como uma dupla camada fina contínua com cerca de 5 nm de espessura. Essa bicamada lipídica determina a estrutura básica da membrana. As moléculas de lipídios constituem cerca de 50% da massa da maioria das membranas celulares animais. Existem cerca de  $5 \times 10^6$  moléculas lipídicas em uma área de  $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$  de bicamada lipídica, ou cerca de  $10^9$  moléculas de lipídios na membrana plasmática de uma pequena célula animal [54]. As proporções relativas de proteínas e lipídios variam com o tipo de membrana, refletindo a diversidade dos papéis biológicos. Cada reino, espécie, tecido ou tipo celular e as organelas de cada tipo celular possuem um conjunto característico de lipídios de membrana [47].

As membranas biológicas são complexas devido à sua composição de lipídios, proteínas e glicoproteínas. Muitos processos que ocorrem na membrana dependem de uma sequência de eventos interligados que envolvem diversas proteínas de membrana coordenadas. Mas conhecendo os componentes individuais é possível fazer deduções razoáveis sobre a sequência de eventos que ocorrem *in vivo* e construir teorias do mecanismo dos processos que podem ser posteriormente testados em células isoladas. Vários tipos de sistema modelo podem ser usados, incluindo os lipossomos ou vesículas. Os lipídios da membrana celular estão em quatro grupos principais: fosfolipídios, esfingolipídios, glicolipídios e esteróis [48].

Vesículas que encerram um volume aquoso com uma membrana de moléculas de lipídios são chamadas de lipossomos. Eles se formam espontaneamente quando certos lipídios são aquecidos acima de uma temperatura crítica em meio aquoso. As vesículas podem ter tamanhos de dezenas de nanômetros à dezenas de micrômetros de diâmetro. Os lipossomos podem ser formados por vários métodos com o controle do tamanho e também do número de bicamadas. As vesículas podem ter uma única membrana de bicamada ou múltiplas lamelas de membranas concêntricas. Lipossomos de diferentes tamanhos requerem métodos diferentes de preparação e são classificados, por conveniência prática, de acordo com o seu tamanho.



**Figura 2.4:** Esquema da formação de uma vesícula lipídica ou lipossomo. (a) Molécula de fosfolípido com a cabeça polar solúvel em água e as caudas hidrofóbicas. Com a adição de água, a tendência é de formação de uma (b) bicamada fosfolipídica e posterior formação do (c) lipossomo.

Os lipossomos, ou vesículas lipídicas, são formados quando filmes lipídicos finos são hidratados e as folhas de bicamadas líquido-cristalinas se tornam fluidas e incham. As folhas de lipídios hidratadas se destacam durante a agitação e se fecham, formando vesículas multilamelares grandes (sigla em inglês, LMV), impedindo a interação da água com o núcleo hidrocarbônico nas bordas das bicamadas (Figura 2.4 c). Uma vez que as partículas são formadas, para reduzir o seu tamanho é necessário o fornecimento de energia, seja de ultrassom (sonicação) ou mecânica (extrusão).

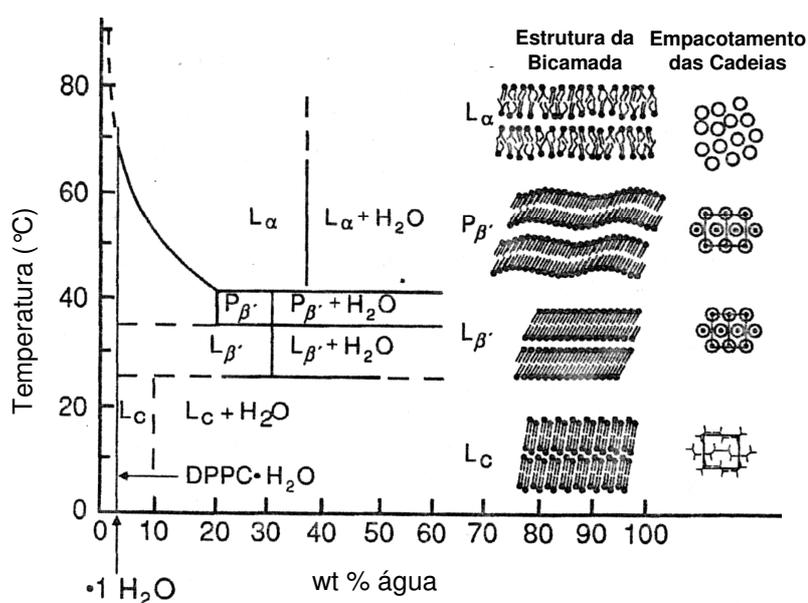
As propriedades das soluções lipídicas podem variar de acordo com a composição (espécies de lipídios catiônicos, aniônicos, neutros), entretanto, o mesmo método de preparação pode ser usado para quaisquer vesículas lipídicas, independente da composição. As etapas gerais do procedimento envolvem a preparação dos filmes por evaporação, a hidratação com agitação, e o dimensionamento para uma distribuição homogênea de vesículas.

As vesículas lipídicas unilamelares no seu estado fluido são as mais importantes para o entendimento dos processos biológicos e para aplicações técnicas. Membranas lipídicas que intumescem espontaneamente em excesso de água exibem muitas estruturas temporárias e coexistentes. A preparação reprodutível de populações unimodais que consistam exclusivamente de vesículas unilamelares requer a aplicação de métodos tais como a sonicação, ultrafiltração, evaporação de solvente e intumescimento [55].

Os fosfolípidos exibem um comportamento interessante na presença de água. Em geral, eles não passam diretamente do estado cristalino para uma solução na presença de água. Várias fases hidratadas são obtidas antes de ocorrer a solução de fosfolípidos em água. Esse comportamento é chamado de mesomorfismo liotrópico. As fases liotrópicas também exibem mesomorfismo termotrópico, ou seja, a fase partícula obtida é uma função do teor de água e

da temperatura. A temperatura de transição de fase termotrópica pode ser observada quando a água se difunde na rede na região polar iônica somente quando a temperatura na qual as cadeias hidrocarbônicas “fundem” é atingida. Se a temperatura é maior que essa, há uma dissociação simultânea da rede iônica pela penetração de água e a fusão da região das cadeias hidrocarbônicas. A temperatura de transição ( $T_c$ ) depende da natureza das cadeias hidrocarbônicas, da região polar da molécula e da quantidade de água presente. Uma vez que a água penetra na rede do anfifílico e a amostra é resfriada abaixo de  $T_c$ , as cadeias hidrocarbônicas se rearranjam em uma rede cristalina ordenada, mas a água não é necessariamente expelida do sistema. Essa fase contendo regiões das cadeias cristalinas é normalmente chamada de gel.

Com a adição de água, a temperatura de transição,  $T^*$ , de um fosfolípido para o qual as cadeias hidrocarbônicas fundem, é diminuída para um valor limitante,  $T_c$ . Essa temperatura de transição é a temperatura mínima necessária para que a água penetre entre as camadas das moléculas de lipídios. Acima da temperatura  $T_c$  no diagrama de fases, o sistema lipídio-água existe em uma fase lamelar mesomórfica, onde as cadeias hidrocarbônicas estão em estado fundido. Quando o sistema é resfriado abaixo de  $T_c$ , as cadeias hidrocarbônicas empacotam ordenadamente. A estrutura dessa fase gel é lamelar, já que as cadeias hidrocarbônicas estão empacotadas em vários tipos de sub-células.

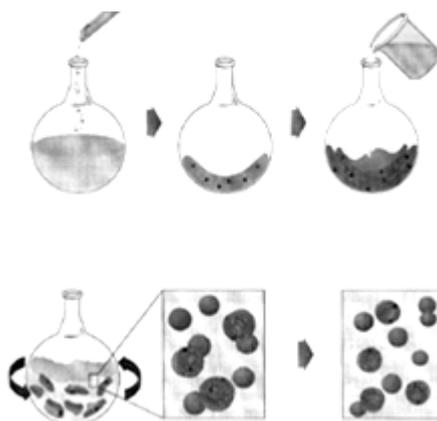


**Figura 2.5:** Diagrama de fase condensada parcial do sistema dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC)-água. Adaptado de [48].

As bicamadas sofrem uma transição térmica entre um estado de temperatura menor, gel, ordenado e o estado líquido cristalino em temperaturas maiores. As membranas modelo sofrem, então, uma transição induzida por temperatura, em que as moléculas de lipídio passam de uma fase ordenada para uma fase desordenada [52].

O estado físico dos lipídios de membrana é influenciado de forma evidente pela temperatura, sendo a mudança mais dramática quando os lipídios sofrem a transição da fase gel para a líquido-cristalina ( $L_{\beta}^I \rightarrow L_{\alpha}$ ). Essa transição, que é altamente cooperativa, ocorre quando as cadeias acila na conformação *all-trans* na fase gel “fundem” com a introdução das mudanças conformacionais *trans-gauche*.

Para preparar os lipossomos, o lipídio deve ser dissolvido em um solvente orgânico. Normalmente esse processo é feito usando clorofórmio. A intenção é obter uma solução lipídica limpa. Normalmente se usa de 10 à 20 mg de lipídio por ml de solvente orgânico. Uma vez que o lipídio está dissolvido no solvente orgânico, o solvente é removido para produzir um filme lipídico. Para volumes de solvente orgânico menores que 1 mL, o solvente pode ser evaporado usando um fluxo de nitrogênio. Para volumes maiores, o solvente orgânico deve ser removido por evaporação rotativa produzindo um filme lipídico fino nas paredes de um tubo com fundo arredondado. O filme lipídico é totalmente seco para remover o solvente orgânico residual colocando o tubo em uma bomba de vácuo durante a noite.



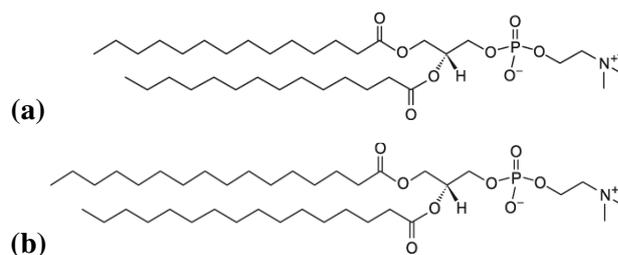
**Figura 2.6:** Etapas da preparação do filme lipídico à hidratação do filme para formação das LMVs [56].

A hidratação do filme lipídico é feita pela adição de um meio aquoso ao recipiente do lipídio seco e agitação por vórtice (Figura 2.6). A temperatura do meio de hidratação deve estar acima da temperatura de transição gel-cristal líquido ( $T_c$ ) do lipídio antes de ser adicionado ao lipídio seco. Após a adição do meio hidratante, a suspensão lipídica deve ser

mantida acima de  $T_c$  no período de hidratação. O tempo de hidratação pode diferir ligeiramente entre as espécies e estruturas lipídicas, mas um tempo de 1 hora com uma agitação vigorosa é sugerido. O meio de hidratação é determinado pela aplicação das vesículas lipídicas. Água destilada, soluções tampão e salinas são meios de hidratação adequados. Durante a hidratação alguns lipídios formam complexos de acordo com a sua estrutura. Lipídios altamente carregados formam um gel viscoso quando hidratados com soluções de baixa força iônica. O produto da hidratação são vesículas grandes multilamelares (em inglês, LMV) com estrutura equivalente a uma cebola, com cada bicamada lipídica separada por uma camada de água. O espaço entre as camadas de lipídios é determinado pela composição, sendo que camadas altamente carregadas têm uma separação maior devido à repulsão eletrostática. Uma vez que uma suspensão de LMV hidratada e estável foi produzida, as partículas podem ser diminuídas em tamanho por várias técnicas, incluindo a sonicação e a extrusão.

A extrusão lipídica é uma técnica em que a suspensão lipídica é forçada a passar através de um filtro de polycarbonato com um tamanho de poro definido para produzir partículas com um diâmetro próximo ao tamanho do poro do filtro utilizado. Assim como todos os procedimentos para diminuir o tamanho das dispersões de LMV, a extrusão deve ser feita a uma temperatura acima da  $T_c$  do lipídio. Tentar extrusar abaixo da  $T_c$  não terá sucesso já que as membranas têm a tendência de se romper com vesículas rígidas que não podem passar através dos poros. A extrusão com filtros de poros de 100 nm normalmente produz vesículas grandes unilamelares (em inglês, LUV), com diâmetro médio de 120 a 140 nm. O tamanho médio das partículas depende da composição lipídica e é bastante reprodutível entre os experimentos [57, 58].

Alguns lipídios utilizados para a formação de lipossomos são o DMPC e o DPPC (Figura 2.7 a e b), que possuem uma cabeça polar zwitteriônica com carga líquida 0 em pH 7,4, duas caudas hidrofóbicas de 14 e 16 carbonos e temperatura de transição ( $T_c$ ) de 23°C e 41°C, respectivamente. A cmc desses fosfolipídios é da ordem de nanomolares, sendo 6 nM para o DMPC, que tem as cadeias mais curtas, e 0,49 nM para o DPPC, com cadeias mais longas.

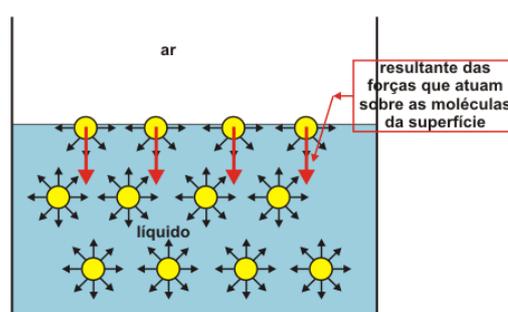


**Figura 2.7:** 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina, o DMPC, com massa molar de 677,933 g/mol, e 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina, o DPPC, com massa molar de 734,039 g/mol.

As bicamadas mais estudadas são as compostas pelo lipídio DPPC, na fase relevante biologicamente, totalmente hidratada,  $L_\alpha$ , que é a fase fluida (F) ou líquido-cristalina, em  $T=50^\circ\text{C}$  [59].

## 2.2 Tensão Superficial

O fenômeno da tensão superficial é explicado em termos das forças de atração de van der Waals de curto alcance entre as moléculas, que são responsáveis pela existência do estado líquido. As moléculas situadas no interior de um líquido são, em média, sujeitas a forças de atração iguais em todas as direções, em quanto as moléculas situadas, por exemplo, numa superfície de separação líquido-ar estão submetidas a forças de atração não-balanceadas ou não-equilibradas, do que resulta uma força em direção ao interior do líquido (Figura 2.8) [51].



**Figura 2.8:** Forças de atração entre moléculas na superfície e no interior de um líquido.

A tensão superficial pode ser adequadamente descrita como o trabalho necessário para aumentar a superfície em uma unidade de área, por um processo isotérmico e reversível. Essa descrição implica numa situação estática. Entretanto, uma superfície líquida aparentemente em repouso se encontra na realidade em estado de grande turbulência, ao nível molecular,

como resultado do movimento de partículas entre o interior e a superfície, e entre a superfície e a fase de vapor.

Materiais tenso-ativos são constituídos por moléculas contendo tanto partes polares como apolares (anfifílicas). A forte adsorção de materiais desse tipo em superfícies de líquidos, formando camadas moleculares orientadas, ou monocamadas, é chamada de atividade superficial. A atividade superficial é um fenômeno dinâmico já que o estado final de uma superfície representa um equilíbrio entre essa tendência a adsorção e a tendência a uma mistura ou dissolução completa, devido ao movimento térmico das moléculas.

A tendência das moléculas tenso-ativas de se acumular na superfície favorece uma expansão da superfície; esta deve, portanto, ser equilibrada ou balanceada frente a tendência da interface de se contrair sob a ação de forças normais de tensão superficial. Se  $\pi$  for a pressão causadora da expansão (ou pressão superficial) de uma camada na qual houve adsorção de uma substância tenso-ativa, a tensão superficial será diminuída em um valor igual a:

$$\gamma = \gamma_0 - \pi \quad (2.1)$$

A formação de uma camada adsorvida numa superfície não é um processo instantâneo, mas é governada pela velocidade de difusão da substância tenso-ativa através da solução, em direção à interface. Podem transcorrer vários segundos até que a solução de uma substância tenso-ativa atinja sua tensão superficial de equilíbrio.

A determinação da cmc por tensão superficial depende da adsorção do monômero de surfactante na interface. A diminuição da tensão superficial, ( $\gamma$ ), com o aumento da concentração monomérica do surfactante,  $[S]$ , é descrito pela isoterma de adsorção de Gibbs, que para uma solução ideal é descrita da seguinte forma:

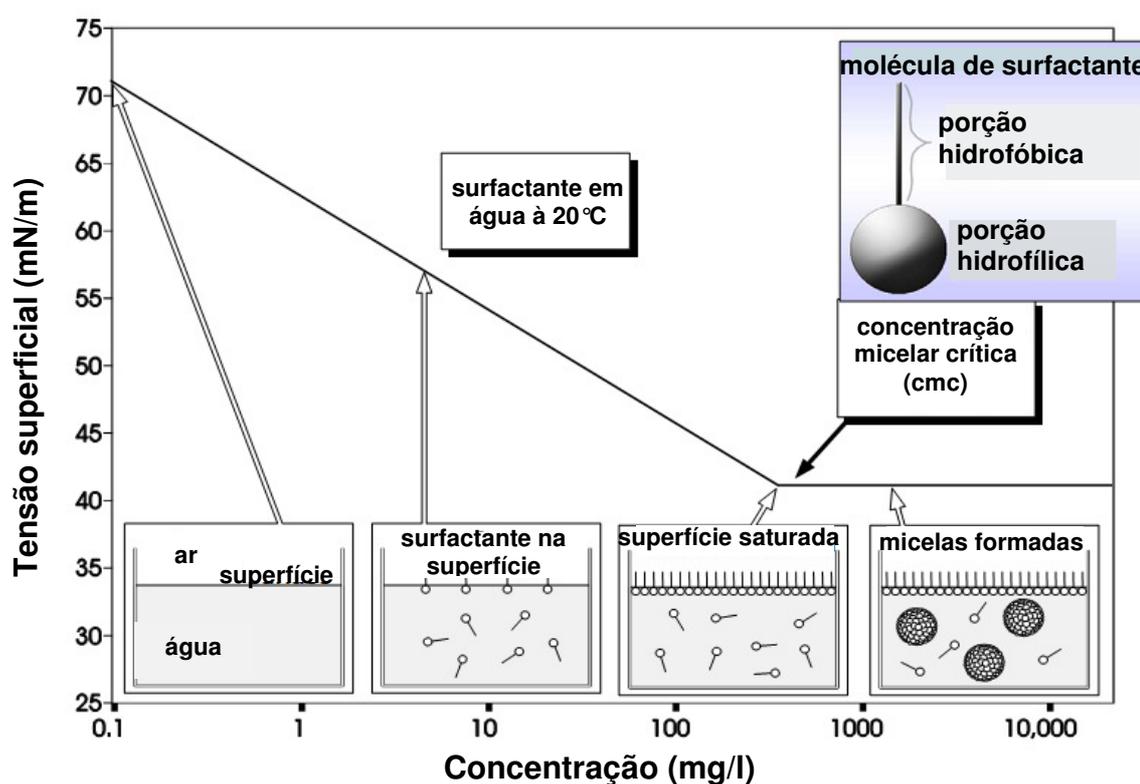
$$\frac{d\gamma}{d \ln[S]} = -x\Gamma_2 RT \quad (2.2)$$

onde  $\Gamma_2$  é o excesso superficial de surfactante na interface, em mols por unidade de área,  $R$  é a constante dos gases ideais e  $T$  é a temperatura absoluta [48].

O excesso superficial é a quantidade de mols por unidade de área que está em excesso na superfície em relação à quantidade que deveria haver se a solução aquosa fosse homogênea até na interface. O parâmetro  $x$  é um inteiro que assume valor 2 para surfactantes iônicos em água. Com a presença de uma concentração de sal de 0,2 M e para surfactantes não-iônicos o valor de  $x$  é 1. Em concentrações intermediárias de sal,  $x$  varia entre 2 e 1. A diminuição de

$\gamma$  com o aumento de  $[S]$  implica em  $\frac{d\gamma}{d[S]}$  e  $\frac{d\gamma}{d \ln[S]}$  negativos, e, portanto,  $\Gamma_2$  positivo. A adsorção positiva de um surfactante na interface é uma das propriedades mais fundamentais de um material tenso-ativo. Com a interface saturada, há um aumento da concentração monomérica do surfactante no interior da solução até atingir a cmc. Acima da cmc a concentração monomérica se torna aproximadamente constante, ou seja,  $d \ln[S]=0$  implicando em  $d\gamma=0$ , indicando que a tensão superficial se torna aproximadamente constante, pois as próprias micelas não são tenso-ativas. Não se pode dizer que ela se torna exatamente constante porque há um equilíbrio dinâmico entre os monômeros e as micelas.

Gráficos de tensão superficial podem ser usados para determinar o excesso superficial e a cmc, tanto de surfactantes iônicos como de não-iônicos (Figura 2.9).



**Figura 2.9:** Determinação da concentração micelar crítica (cmc) a partir de medidas de tensão superficial em função da concentração de surfactante.

### 2.2.1 Método da Gota Pendente

O método da gota pendente é baseado na formação de uma gota na ponta de uma agulha verticalmente posicionada, ligada a um sistema de finas mangueiras ligadas a uma seringa, onde é colocada a solução a ser injetada. Para obter a imagem da gota, há um sistema de câmera que filma a uma alta taxa de frames/segundo. A imagem da gota é projetada na tela do computador. Então, um *software* é responsável pelo cálculo da tensão superficial. Para isso, é traçado o perfil da gota, e a partir de considerações de simetria e das relações da tensão superficial com o raio de curvatura, a tensão superficial é calculada.

Esse método é utilizado para medir a tensão superficial de um líquido suspenso no ar a partir da determinação do perfil da gota pendente em equilíbrio mecânico, ou seja, quando as forças de superfície são iguais à força da gravidade. A forma em equilíbrio da gota é descrita pela equação de Young-Laplace

$$\gamma_L \left( \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) = \Delta\rho \cdot g \cdot z(x, y) \quad (2.3)$$

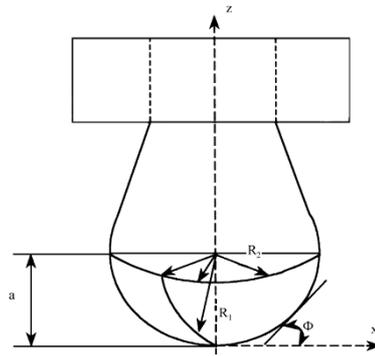
Esse equilíbrio pode ser descrito por uma equação diferencial de segunda ordem e sem solução analítica, conhecida como equação de Bashforth e Adams. Essa equação [60], que é baseada na equação de Laplace, relaciona os parâmetros geométricos do perfil da gota, descritos pelo fator de forma  $B$ , que relaciona o raio do ápice da gota  $R_a$  com a densidade do líquido e a tensão superficial, através de uma equação diferencial não linear:

$$2 - B \frac{z}{R_a} = \frac{1}{\frac{R_1}{R_a}} + \frac{\text{sen}\phi}{\frac{x}{R_a}} \quad (2.4)$$

sendo  $B$  definido por

$$B = \frac{R_a^2 g \Delta\rho}{\gamma} \quad (2.5)$$

onde  $\Delta\rho$  é a diferença de densidade do líquido e do ar,  $g$  é a aceleração da gravidade,  $\gamma$  é a tensão superficial,  $R_a$  é o raio de curvatura no ápice da gota,  $x$ ,  $z$  e  $\phi$  são as coordenadas definidas na Figura 2.10, e  $R_1$  é o raio de curvatura do ponto com coordenadas  $(x, z)$ .



**Figura 2.10:** Geometria da gota pendente. Fonte: [61].

Os valores de  $R_1$  e  $\phi$  são obtidos pela geometria da gota a partir de equações diferenciais.

$$R_1 = \frac{ds}{d\phi} = \frac{\left\{ 1 + \left( \frac{dz}{dx} \right)^2 \right\}^{\frac{3}{2}}}{\frac{d^2z}{dx^2}} \quad (2.6)$$

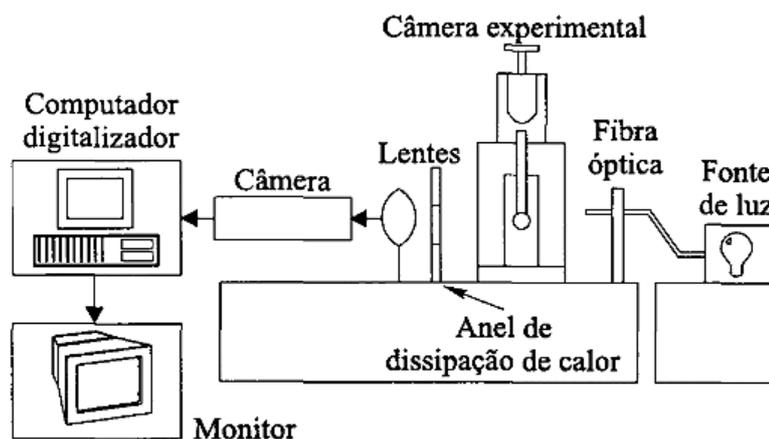
$$\text{sen } \phi = \frac{\frac{dz}{dx}}{\left\{ 1 + \left( \frac{dz}{dx} \right)^2 \right\}^{\frac{1}{2}}} \quad (2.7)$$

A tensão superficial é obtida pela comparação entre o perfil da gota experimental e o perfil teórico definido pela Equação (2.4).

Em 1882, Bashforth e Adams deduziram a forma teórica da gota pendente e calcularam tabelas dos contornos da gota. Essas tabelas podem ser usadas para determinar a tensão superficial ajustando o contorno da gota medido experimentalmente a curva teórica. Fotografias da evolução da gota seriam tiradas em função do tempo para comparação. Mas esse método usa poucas medidas para definir o formato inteiro da gota, levando à imprecisão na comparação entre o perfil experimental e a solução numérica da equação de Bashforth e Adams. Outro problema encontrado é a determinação do tempo em que o equilíbrio mecânico da gota é atingido.

Progressos recentes na análise de imagens e nos sistemas de aquisição de dados tornaram possível obter uma digitalização direta da imagem da gota com a adição de uma placa de captura de vídeo de uma câmera digital. Os sinais digitais são analisados usando diferentes algoritmos para determinar a tensão superficial a partir do perfil da gota.

Um equipamento típico de gota pendente consiste de três partes: uma célula experimental, um sistema de iluminação para visualização da gota e um sistema de aquisição de dados para inferir a tensão superficial a partir do perfil da gota pendente [62]. A Figura 2.11 apresenta um desenho esquemático do equipamento.



**Figura 2.11:** Equipamento da gota pendente. Fonte: [62].

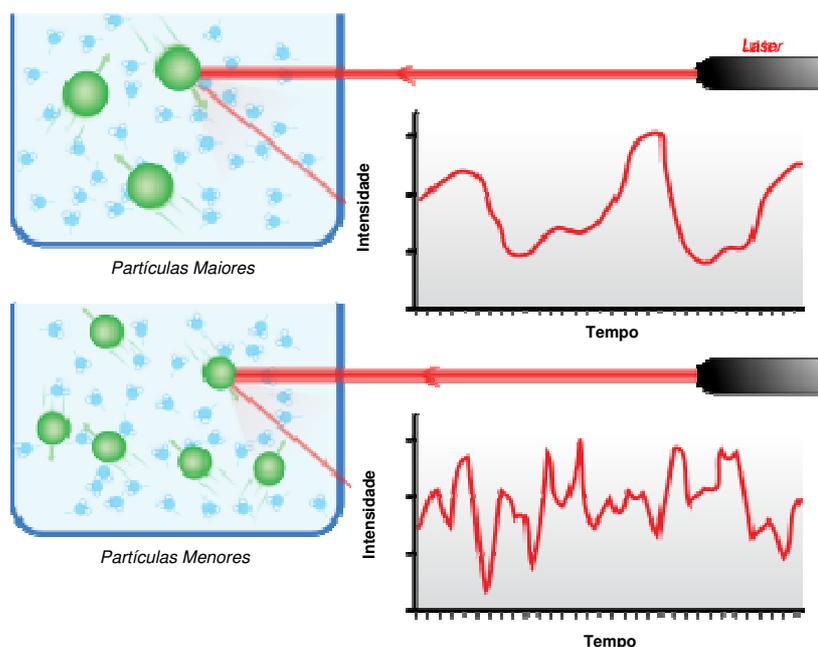
O sistema da gota pendente permite registrar a evolução de uma gota da solução de interesse em função do tempo. Imagens da gota são feitas automaticamente a certa frequência que depende do tempo de duração do teste. As imagens são digitalizadas por uma placa de aquisição no computador e são analisadas na hora, medindo, portanto, a tensão superficial durante o experimento. Os contornos da gota são analisados para inferir a tensão superficial a partir do perfil da gota utilizando diferentes programas. O processo de digitalização e análise da gota consiste de quatro etapas: 1) captura e digitalização da imagem da gota pendente; 2) extração do contorno da gota, e determinação do raio de curvatura no ápice, necessário para o cálculo da tensão superficial; 3) suavização do contorno da gota usando regressão polinomial; 4) comparação do formato da gota teórica e da experimental, inferindo o valor da tensão superficial.

### 2.3 Espalhamento Dinâmico de Luz

O espalhamento dinâmico de luz mede a radiação espalhada em comprimentos de onda ligeiramente diferentes daqueles do feixe incidente. Moléculas em movimento alteram o comprimento de onda da radiação devido ao efeito Doppler. Se não há um movimento líquido resultante, as flutuações no número de moléculas espalhadoras resultam em uma distribuição

de comprimentos de onda da luz espalhada. A distribuição é bastante estreita, e uma fonte de luz extremamente monocromática é necessária [63].

Partículas com diâmetros na ordem de 1 a 5000 nm, dependendo da amostra e da potência do laser disponível, podem ser medidas utilizando o método de espectroscopia de correlação de fóton (sigla em inglês, PCS). Uma das características das partículas em solução é que elas estão em constante movimento térmico, ou Browniano. Esse movimento provoca um padrão de *speckle* de movimento na intensidade de luz espalhada pelas partículas. Esse movimento pode ser detectado como uma variação na intensidade com o tempo a partir de uma óptica e uma fotomultiplicadora adequada. Partículas grandes se movem mais lentamente que partículas pequenas, portanto a taxa de flutuação da luz espalhada por elas é também mais lenta. A espectroscopia de correlação de fóton utiliza a taxa de variação dessas flutuações para determinar a distribuição de tamanhos das partículas espalhadoras de luz [64].



**Figura 2.12:** Exemplo da medida de espalhamento dinâmico de luz de duas amostras: uma de partículas grandes e uma de partículas pequenas, e a intensidade da luz espalhada em função do tempo.

Os canais do correlacionador multiplicam as intensidades da luz separadas por um tempo de atraso. Para tempos de atraso menores, os quais são pequenos quando comparados às flutuações, o produto das intensidades é grande, ou seja, o grau de correlação é alto. Para canais com tempos de correlação longos, quando não há correlação entre as intensidades, o produto das intensidades é muito pequeno, o que resulta em uma função de correlação que decai exponencialmente.

A análise da função de auto correlação obtida, permite o cálculo do coeficiente de difusão translacional das partículas que estão em movimento Browniano. O tamanho da partícula pode, então, ser calculado a partir do coeficiente de difusão, da temperatura e da viscosidade do meio.

Vários algoritmos matemáticos podem ser utilizados para transformar a função de auto correlação em distribuição de tamanhos.

## 2.4 Espectroscopia de Transições Eletrônicas

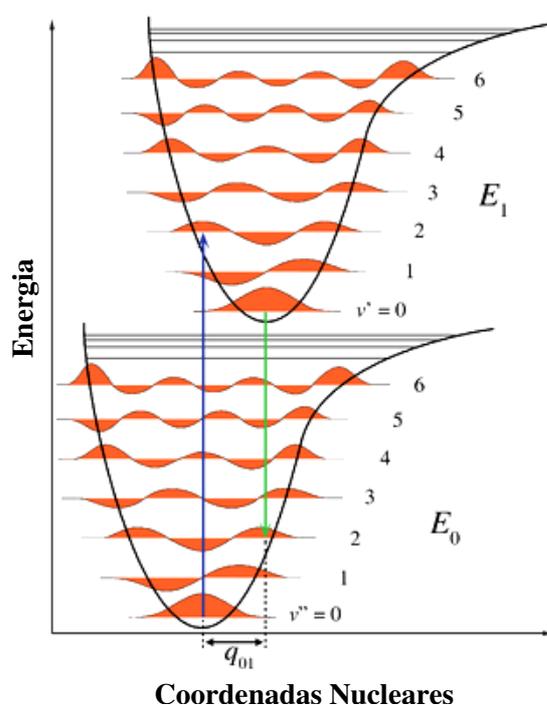
Um experimento de espectroscopia típico é feito com a incidência de uma radiação eletromagnética em um determinado comprimento de onda nominal  $\lambda$  sobre a amostra. Então propriedades da radiação que emerge da amostra são medidas. Uma das propriedades mais simples é a fração da radiação incidente que é absorvida pela amostra, dada pela espectroscopia de absorção óptica. Também é possível examinar a radiação emitida pela amostra em comprimentos de onda diferentes daquele utilizado na excitação, através da espectroscopia de fluorescência. Algumas técnicas mais complexas detectam, além da intensidade, o tipo e o grau de polarização da radiação emitida pela amostra, como a polarização ou anisotropia [63].

As energias necessárias para alterar a distribuição de elétrons nas moléculas são da ordem de diversos elétrons-volt (eV). Os fótons absorvidos ou emitidos nessas alterações estão, portanto, nas regiões visível ou ultravioleta do espectro. Após a transição eletrônica, os núcleos de uma molécula estão sujeitos a forças diferentes das que atuavam antes da transição, levando a molécula a sofrer vibrações. Em líquidos, essas transições vibracionais se confundem formando bandas largas [65].

### 2.4.1 Absorção

A absorção de um fóton está relacionada à excitação de elétrons que pertencem a um pequeno grupo de átomos, os cromóforos, que são os responsáveis pela coloração das substâncias. O alargamento das bandas de absorção eletrônicas nas amostras líquidas pode ser atribuído à respectiva estrutura vibracional, que em geral não pode ser resolvida em solução. Em consequência da transição, a densidade de elétrons aumenta rapidamente em determinadas

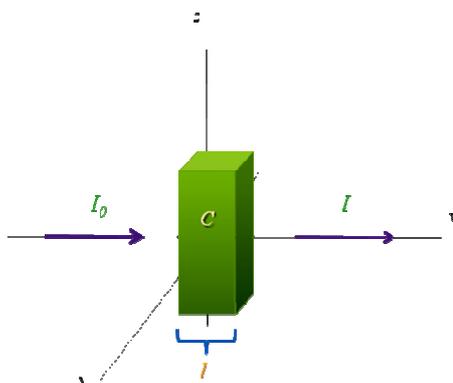
regiões da molécula, e diminui em outras, e os núcleos, inicialmente estacionários, sofrem subitamente a ação de um novo campo de forças, respondendo a esse campo entrando em vibrações e oscilando. O princípio de Franck-Condon diz que, em virtude de os núcleos serem muito mais pesados do que os elétrons, uma transição eletrônica ocorre com rapidez muito maior do que os núcleos podem responder. A transição eletrônica mais provável é tal que a separação entre os núcleos seja a separação de equilíbrio,  $R_e$ . Assim, a transição é para um estado vibracional do estado eletrônico excitado que está verticalmente acima do estado fundamental nas curvas de potencial em função da distância de separação entre os núcleos (Figura 2.13).



**Figura 2.13:** Curvas de potencial em função da separação entre os núcleos e transição vertical obedecendo ao Princípio de Franck-Condon.

A espectroscopia de absorção eletrônica é uma técnica usada para desde a determinação de concentrações até a resolução de complexas questões estruturais. Quando a luz na frequência adequada é absorvida, a molécula pode ser excitada a um dos muitos níveis de rotação-vibração do primeiro estado eletrônico excitado. O espectro é, então, composto de um grande número de bandas espectrais muito próximas. Na prática, essas bandas são tão largas que se observa somente um envelope espectral relativamente suavizado. Entre as causas do alargamento das bandas está a heterogeneidade do ambiente [63].

Um diagrama esquemático da medida de absorção de luz é ilustrado na Figura 2.14. A luz incidente de intensidade  $I_0$  no comprimento de onda  $\lambda$  atinge a amostra, com concentração  $C$  em moles por litro de moléculas absorvedoras em solução, por um caminho de comprimento de  $l$  cm. A luz que não é absorvida pela amostra emerge com intensidade  $I$ .



**Figura 2.14:** Esquema da medida de absorção de luz.

Considerando uma amostra de moléculas em uma camada suficientemente fina perpendicular à direção da propagação da luz ( $dl$ ) tal que a intensidade da luz dentro dessa camada é essencialmente constante, a fração de luz absorvida ( $-dI/I$ ) deve ser proporcional ao número de moléculas absorvedoras:

$$-dI/I = C\varepsilon' dl \quad (2.8)$$

onde  $\varepsilon'$  é a constante de proporcionalidade, chamada coeficiente de absorção molar, e é independente da concentração para um conjunto de moléculas que não interajam, e contém a dependência em comprimento de onda ou frequência do espectro de absorção. Integrando a Equação (2.11) em toda a amostra, ou seja, de  $I_0$  até  $I$  e de  $0$  à  $l$ ,

$$\ln(I_0/I) = C\varepsilon' l \quad (2.9)$$

Convertendo para log na base 10,

$$\ln(I_0/I) = \frac{\log_{10}(I_0/I)}{\log_{10} e} = 2,303 \times \log(I_0/I) \quad (2.10)$$

obtém-se a forma comum da lei de Beer-Lambert

$$A(\lambda) \equiv \log(I_0/I) = C\varepsilon(\lambda)l \quad (2.11)$$

onde  $\varepsilon = \varepsilon'/2,303$  e  $A$  é a absorbância.

O coeficiente de absorção molar varia com a natureza do composto absorvente, com o solvente, com o comprimento de onda e com o pH da solução [47].

Valores mais precisos de  $A$  são obtidos no intervalo de 0,1 à 2, já que valores menores significam que somente uma fração muito pequena da luz incidente foi absorvida, e valores maiores mostram que somente uma pequena fração da luz incidente atinge o detector.

O que interessa é o espectro da molécula e não o do solvente. Portanto normalmente é medida a diferença na absorbância entre a molécula em solução e o branco de solvente.

A intensidade  $I_A$  do feixe que emerge da amostra é, de acordo com a Equação (2.11), tal que

$$\log I_A = \log I_0 - A_A \quad (2.12)$$

e, similarmente, a intensidade transmitida do feixe na referência,  $I_R$  é

$$\log I_R = \log I_0 - A_R \quad (2.13)$$

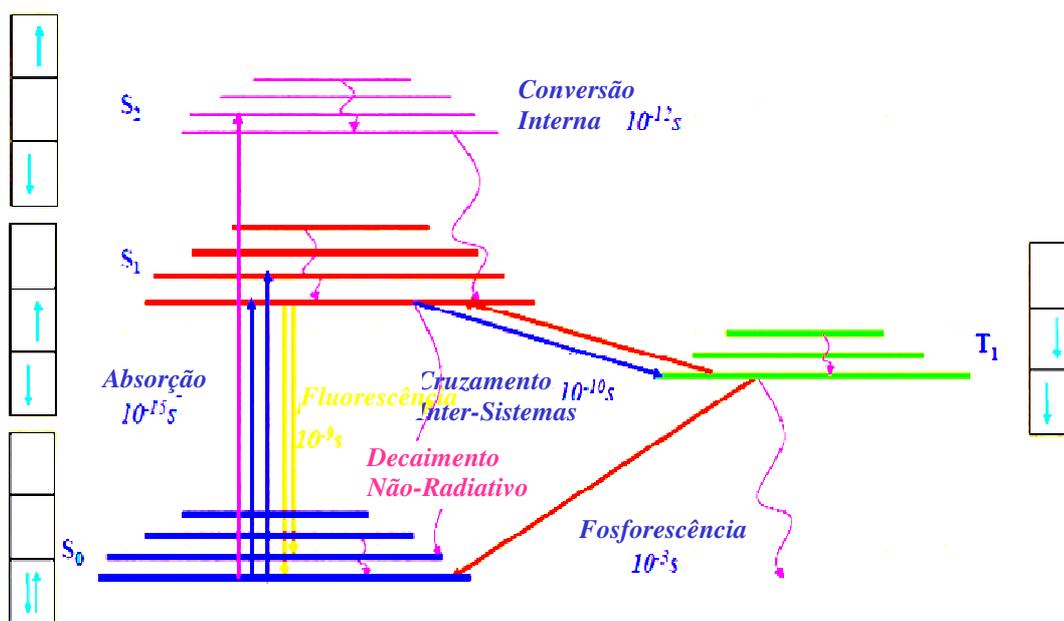
então, a detecção de  $\log I_R/I_A$  dá a medida de  $A_A - A_R$ .

#### 2.4.2 Fluorescência

A absorção inicial leva a molécula a um estado eletrônico excitado. A molécula excitada pode sofrer colisões com as moléculas vizinhas e ceder energia de forma não radiativa, em etapas dos níveis vibracionais, até atingir o nível de vibração mais baixo do estado eletrônico excitado da molécula. Então, se a grande diferença de energia que leva a molécula até o estado eletrônico fundamental não for cedida às moléculas circundantes, a molécula excitada pode sofrer emissão espontânea, em  $10^{-9}$ s, e emitir o excesso de energia na forma de radiação. De acordo com o princípio de Franck-Condon, a transição eletrônica de emissão é vertical, tendo o espectro de fluorescência a estrutura vibracional característica do estado eletrônico fundamental [65].

O processo de decaimento radiativo é dado pela emissão de um fóton pela molécula para perder a energia de excitação. O decaimento não-radiativo é mais comum, com a energia em excesso sendo transferida para vibrações, rotações e translações das moléculas vizinhas, ou seja, a energia é transformada no movimento térmico do ambiente, na forma de calor.

Se a radiação é espontaneamente emitida e cessa imediatamente após a interrupção da radiação de excitação, o processo é chamado de fluorescência. Na fosforescência a emissão espontânea persiste durante intervalos de tempo longos após a excitação.



**Figura 2.15:** Diagrama de Perrin-Jablonski com os tempos característicos dos processos de excitação eletrônica e emissão e os esquemas dos *spins* eletrônicos de cada estado de energia.

A fluorescência ocorre em frequências mais baixas do que a da radiação de excitação, pois a transição radiativa ocorre somente após parte da energia vibracional se dispersar no ambiente. Assim, o espectro de emissão sempre está deslocado para maiores comprimentos de onda em relação ao espectro de absorção. A diferença entre os comprimentos de onda de emissão e de excitação é chamada de deslocamento de Stokes.

Os dados de fluorescência podem ser analisados considerando os seguintes parâmetros: o espectro de emissão de fluorescência, com análise do comprimento de onda e da intensidade do pico de emissão; o espectro de excitação de fluorescência; o rendimento quântico; a anisotropia de emissão de fluorescência; o tempo de vida da fluorescência e o decaimento da anisotropia.

O tempo característico do processo de absorção é de  $10^{-15}$  s. Já o tempo de vida dos estados excitados singleto, que resulta na emissão de fluorescência, e tripleto, que resulta na fosforescência, são de  $10^{-10}$  a  $10^{-7}$  s e  $10^{-6}$  a 1 s, respectivamente. Essa diferença nos tempos de vida ocorre devido ao *spin* do elétron no estado excitado, que é inverso ao do estado fundamental no caso da fluorescência e o mesmo para a fosforescência, resultando em uma transição proibida para o estado fundamental, o que leva o elétron a demorar mais para retornar ao estado fundamental (Figura 2.15).

Como citado acima, o tempo de vida de fluorescência é da ordem de 0,1 a 100 ns. Esses tempos podem ser medidos pelo método de espectroscopia de fluorescência com resolução temporal utilizando um laser pulsado como fonte de excitação.

Nesse trabalho estamos interessados na emissão de fluorescência. As moléculas utilizadas apresentam alto rendimento quântico de fluorescência, ou seja, boa parte da energia é perdida por fluorescência.

O conceito de rendimento quântico é descrito pela Equação:

$$\phi = \frac{k_f}{k_f + \sum_i k_i} \quad (2.14)$$

onde  $k_f$  é a taxa de emissão de fluorescência e  $\sum_i k_i$  é a soma de todas as taxas de perda de energia que não são por fluorescência, ou seja, o rendimento quântico dá a porcentagem de moléculas no estado eletrônico excitado que decaem para o estado fundamental por emissão fluorescente. O rendimento quântico é sempre menor ou igual à unidade, é característico da estrutura da molécula, e para compostos não-fluorescentes é igual a zero.

A taxa de emissão fluorescente é dada por

$$k_f = \frac{1}{\tau_0} \quad (2.15)$$

onde  $\tau_0$  é o tempo de vida do estado excitado.

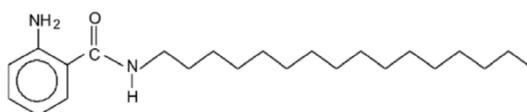
Experimentalmente, o rendimento quântico,  $Q_D$ , é calculado utilizando os valores da área do espectro de emissão de fluorescência,  $\int F(\lambda) d\lambda$ , do pico de absorbância,  $A(\lambda)$ , da amostra de referência e da amostra de interesse, e do rendimento quântico da amostra de referência,  $\phi_{referência}$ , como apresentado na Equação (2.16), sendo que as medidas devem ser feitas nas mesmas condições experimentais, incluindo o meio. A amostra de referência é um composto cujo rendimento quântico já é conhecido.

$$Q_D = \phi_{amostra} = \frac{\int_{\lambda_i}^{\lambda_f} F_{amostra}(\lambda) d\lambda}{\int_{\lambda_i}^{\lambda_f} F_{referência}(\lambda) d\lambda} \frac{A_{referência}(\lambda)}{A_{amostra}(\lambda)} \phi_{referência} \quad (2.16)$$

Quando a concentração da sonda é aumentada, a probabilidade de as moléculas excitadas interagirem com as outras e perderem energia através de outros processos que não a emissão fluorescente aumenta. Esse efeito faz com que a intensidade de fluorescência relativa à concentração da sonda não aumente mais linearmente, como resultado do efeito de filtro interno.

### 2.4.3 Sondas Fluorescentes

O composto 2-amino-N-hexadecil-benzamida, Ahba, é uma sonda fluorescente lipofílica, formada pelo fluoróforo, o ácido *o*-aminobenzóico, ligado covalentemente à cadeia acila hexadecilamina. O comportamento da sonda é dependente da polaridade do meio: as posições espectrais de absorção e emissão, o rendimento quântico e o decaimento do tempo de vida indicam comportamentos distintos em água quando comparados ao etanol e ao ciclohexano. A sonda dissolve nos solventes orgânicos, como indicado pelos valores muito baixos da anisotropia de fluorescência de estado estacionário e os tempos de correlação rotacional curtos obtidos em medidas de decaimento da anisotropia de fluorescência. Por outro lado, a sonda tem baixa solubilidade em água, levando à formação de agregados em meio aquoso. O complexo espectro de absorção em água é interpretado como originário das diferentes formas de agregação, como deduzido da dependência do comprimento de onda dos parâmetros de anisotropia. A sonda interage com surfactantes nas formas micelar e pré-micelar, como observado em experimentos na presença de *n*-dodecilsulfato de sódio (SDS), brometo de *n*-cetiltrimetilamônio (CTAB), propano-1-sulfonato de 3-(dodecil-dimetilamônio) (DPS) e propano-1-sulfonato de 3-(hexadecil-dimetilamônio) (HPS), e com vesículas do fosfolipídio dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC). Os resultados demonstram que o Ahba é capaz de monitorar propriedades tais como potencial elétrico de superfície e transição de fase de micelas e vesículas [46].

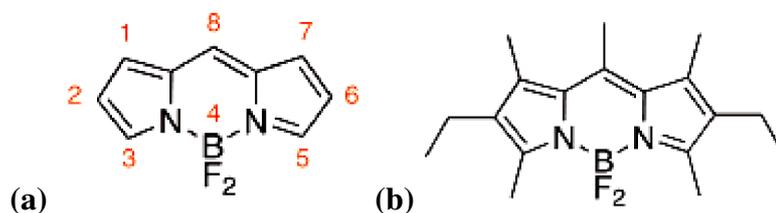


**Figura 2.16:** Molécula da sonda fluorescente Ahba (ácido *orto*-aminobenzóico-hexadecilamina).  
Fonte: [46].

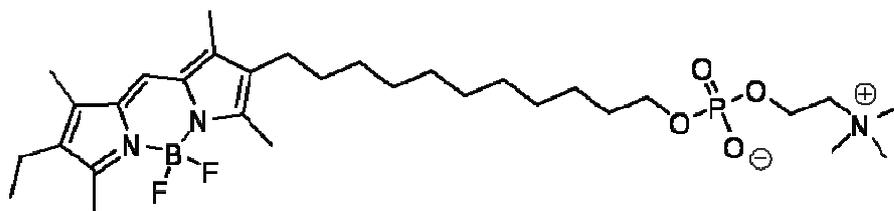
A sonda fluorescente lipofílica Ahba foi sintetizada a partir do ácido *orto*-aminobenzóico, *o*-Abz, ligada a uma longa cadeia hexadecilamida. Em água, o *o*-Abz tem uma banda de absorção em 310 nm. Por outro lado, o caráter hidrofóbico da cadeia alifática do Ahba resulta em uma solubilidade muito baixa em água e a posição da banda de absorção em meio aquoso em 335 nm é atribuída à formação de agregados. O coeficiente de absorção molar do Ahba em água é de  $2670 \pm 72 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , e  $2960 \pm 21 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  em etanol. Já seu rendimento quântico é de 0,38 em água e 0,78 em etanol [46].

Alguns estudos na relação estrutura-atividade antiparasita para as aquilfosfocolinas apontam para uma localização preferencial do grupo fluorescente no extremo da cadeia alquila saturada, mantendo intacto o grupo essencial fosfocolina, e com um comprimento total da parte lipofílica próximo àquele de uma cadeia de polimetileno de 16 à 18 carbonos. A cabeça polar fosfocolina e a cadeia alquila saturada são mantidas, e o grupo emissor é o fluoróforo lipofílico BODIPY (Figura 2.17). Essa sonda absorve e emite no visível em comprimentos de onda convenientes para experimentos biológicos, com alto brilho e foto-estabilidade muito melhor. Com o objetivo de mimetizar a conformação linear da droga original, a cadeia alquila deve ser ligada à posição 2 do grupo BODIPY. Foi sintetizado um análogo com o grupo BODIPY na posição terminal da cadeia alquila com um grupo etil (Figura 2.18). Tal análogo apresenta comprimento de onda de absorção máximo de 527 nm em metanol e 529 nm em etanol, emissão em 536 nm com excitação em 502 nm, rendimento quântico 0,94 e coeficiente de absorção molar de 82.000 e 79.000 nos dois solventes citados, respectivamente. O análogo tem excelentes propriedades espectroscópicas para a aplicação como sondas da atividade antiparasita: alto coeficiente de absorção molar no visível, emissão amarela intensa, alto rendimento quântico próximo à unidade, e alta foto-estabilidade.

A concentração de MT-BODIPY necessária para inibir 50% da proliferação do parasita em promastigotas de *Leishmania donovani* é de 4,3  $\mu\text{M}$ , enquanto a concentração de MT é de 6,5  $\mu\text{M}$ , portanto, a atividade anti-parasita do análogo fluorescente condiz com a da droga original. O método de síntese introduziu o grupo BODIPY altamente fluorescente na parte não-polar do lipídio, alinhado com a cadeia alquila e com perturbação mínima das propriedades anfipáticas da molécula original [44].



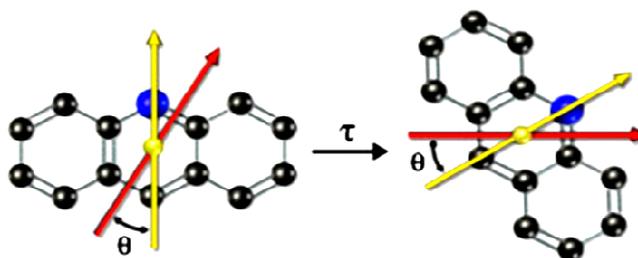
**Figura 2.17:** (a) Sonda BODIPY: 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno [44], e (b) com o grupo etil no carbono da posição 6, com comprimento de onda de absorção máximo de 517 nm e de emissão de 546 nm, com rendimento quântico de 0,70 [66].



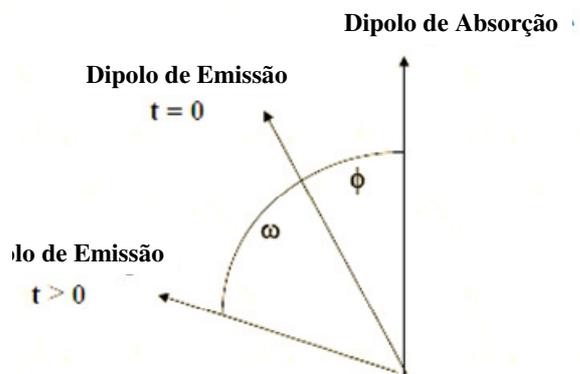
**Figura 2.18:** O análogo fluorescente da MT, 6Et-BODIPY-11C-PC: 11-(4,4-Difluoro-6-etil-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-2-il) *n*-undecilfosfatidilcolina, aqui chamado de MT-BODIPY.

#### 2.4.4 Anisotropia de Fluorescência

O fenômeno de anisotropia de fluorescência é baseado na existência de momentos de transição para absorção e emissão que estão em direções específicas dentro da estrutura do fluoróforo (Figura 2.19). Em solução homogênea o estado fundamental dos fluoróforos está aleatoriamente orientado, mas quando expostos a luz polarizada, aqueles fluoróforos que têm seu momento de transição de absorção orientados na direção do vetor campo elétrico da luz incidente são preferencialmente excitados e, por isso, a população de estado excitado tem uma direção de orientação preferencial. Uma causa da despolarização é a difusão rotacional dos fluoróforos. As medidas de anisotropia dão uma idéia do deslocamento angular médio do fluoróforo entre a excitação por absorção do fóton e a subsequente emissão de um fóton (Figura 2.20). Os movimentos de rotação dependem da viscosidade do solvente e da dimensão da molécula do próprio fluoróforo ou do agregado em que ele está inserido. A dependência da anisotropia de fluorescência com o movimento rotacional tem aplicação em pesquisa bioquímica, já que a escala de tempo da difusão rotacional de biomoléculas é comparável ao tempo de decaimento de muitos fluoróforos [67].



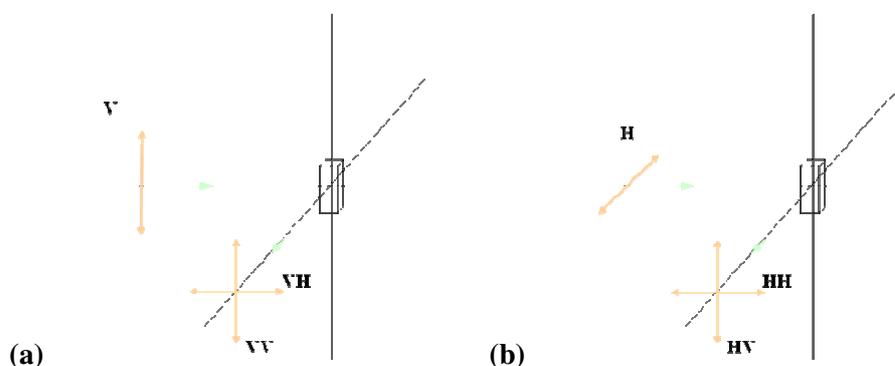
**Figura 2.19:** Esquema dos momentos de transição de absorção (amarelo) e emissão (vermelho) de um fluoróforo, e sua despolarização entre a excitação e a emissão.



**Figura 2.20:** Esquema dos dipolos de absorção e de emissão com um ângulo  $\phi$  entre eles para  $t=0$ , e representação do ângulo  $\omega$  do dipolo de emissão entre a absorção e a emissão.

Para obter os valores de anisotropia, a qual é definida pela Equação (2.17), as medidas podem ser realizadas pelo método de canal único ou de formato-L, como está explicado a seguir.

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \tag{2.17}$$



**Figura 2.21:** Esquema do equipamento para medida de anisotropia de fluorescência.

A amostra é excitada com luz polarizada verticalmente, ou seja, com o vetor campo elétrico da luz de excitação orientado paralelamente ao eixo vertical (Figura 2.21 a). Então, através de um polarizador ora orientado verticalmente (paralelo à emissão) e ora horizontalmente (perpendicular), a intensidade da emissão é observada ( $I_{\parallel}$  e  $I_{\perp}$ , respectivamente). As intensidades observadas verticalmente e horizontalmente quando a amostra é excitada verticalmente, são, respectivamente,

$$I_{VV} = kS_V I_{\parallel} \tag{2.18}$$

$$I_{VH} = kS_H I_{\perp} \quad (2.19)$$

sendo  $k$  um fator de proporcionalidade que leva em consideração o rendimento quântico do fluoróforo. Dividindo a Equação (2.18) pela Equação (2.19), obtém-se:

$$\frac{I_{VV}}{I_{VH}} = \frac{S_V}{S_H} \frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}} = G \frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}} \quad (2.20)$$

Assim, para encontrar a razão das intensidades de emissão paralela e perpendicular à excitação, deve-se calcular o fator  $G$ , que é dado pela razão entre as sensibilidades do sistema de detecção para a luz polarizada verticalmente e horizontalmente, como mostra a equação abaixo

$$G = \frac{S_V}{S_H} \quad (2.21)$$

Para medir o fator  $G$ , utiliza-se excitação horizontalmente polarizada (Figura 2.21 b). Quando a excitação é horizontal, como o sistema de detecção é de canal único e é feito em formato de L, a detecção será perpendicular a excitação tanto para o polarizador orientado verticalmente quanto horizontalmente, e as intensidades devem ser iguais. Mas pode haver diferenças entre esses valores, e essas diferenças devem ser devido às propriedades de detecção do sistema. Então

$$\frac{I_{HV}}{I_{HH}} = \frac{S_V}{S_H} \frac{I_{\perp}}{I_{\perp}} = \frac{S_V}{S_H} = G \quad (2.22)$$

Conhecendo o fator  $G$ , calcula-se a razão  $\frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}}$ . Substituindo a Equação (2.22) na Equação (2.20),

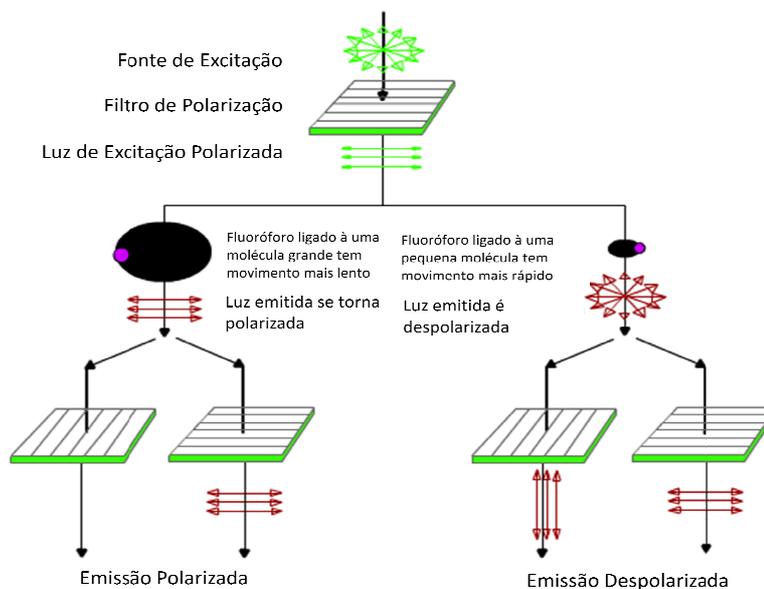
$$\frac{I_{VV}}{I_{VH}} \frac{1}{G} = \frac{I_{VV}}{I_{VH}} \frac{I_{HH}}{I_{HV}} = \frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}} \quad (2.23)$$

Como a anisotropia é definida pela Equação(2.17), pode-se escrever

$$r = \frac{(I_{\parallel} / I_{\perp}) - 1}{I_{\parallel} / I_{\perp} + 2} \quad (2.24)$$

que pode ser escrita na forma alternativa

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad (2.25)$$

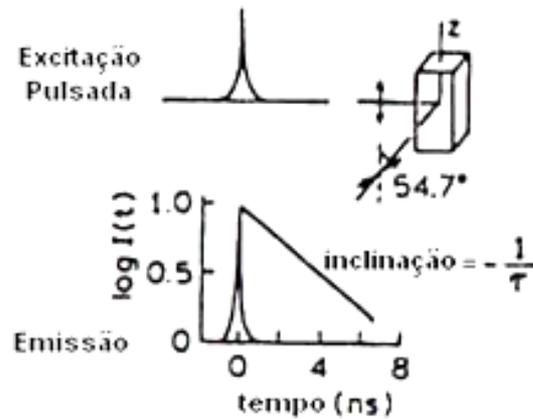


**Figura 2.22:** Esquema da polarização da emissão de moléculas grandes e pequenas.

Para moléculas pequenas,  $I_{\parallel} \sim I_{\perp}$ , o que resulta em  $r = 0$ , ou seja, uma emissão despolarizada (Figura 2.22).

### 2.4.5 Tempo de Vida

Na fluorescência resolvida no tempo, ou fluorometria no domínio do tempo, a amostra é excitada com um pulso de luz (Figura 2.23). A largura do pulso é feita tão pequena quanto possível e é preferencialmente muito menor que o tempo de decaimento  $\tau$  da amostra. A intensidade em função do tempo é medida após o pulso de excitação, e o tempo de decaimento  $\tau$  é calculado a partir da inclinação de um gráfico do  $\log I(t)$  versus  $t$ . Quando as medidas do decaimento da intensidade são feitas através de um polarizador orientado a  $54,7^\circ$  do eixo vertical  $z$ , os efeitos da difusão rotacional e da anisotropia no decaimento da intensidade são evitados.



**Figura 2.23:** Medidas de tempo de vida no domínio do tempo. Adaptado de: [67].

Uma amostra contendo o fluoróforo é excitada com um pulso de luz de função  $\delta$ , resultando em uma população inicial  $n_0$  de fluoróforos no estado excitado. A população no estado excitado decai com uma taxa  $\Gamma + k_{nr}$ :

$$\frac{dn(t)}{dt} = -(\Gamma + k_{nr})n(t) \quad (2.26)$$

onde  $n(t)$  é o número de moléculas excitadas num tempo  $t$  após a excitação,  $\Gamma$  é a taxa emissiva, e  $k_{nr}$  é a taxa de decaimento não radiativo. A emissão é um evento randômico, e cada fluoróforo excitado tem a mesma probabilidade de emitir em um dado período de tempo, resultado em um decaimento exponencial da população do estado excitado

$$n(t) = n(0) \exp(-t / \tau) \quad (2.27)$$

Nos experimentos de fluorescência, não se observa o número de moléculas excitadas, mas a intensidade de fluorescência, que é proporcional à  $n(t)$ , portanto, a Equação (2.26), pode ser escrita em termos da intensidade dependente do tempo  $I(t)$ . A integração dessa equação resulta na expressão de um decaimento exponencial simples

$$I(t) = I_0 \exp(-t / \tau) \quad (2.28)$$

onde  $I_0$  é a intensidade no tempo zero. O tempo de vida  $\tau$  é o inverso da taxa de decaimento total

$$\tau = (\Gamma + k_{nr})^{-1} \quad (2.29)$$

Em geral, o inverso do tempo de vida é a soma das taxas que despovam o estado excitado. O tempo de vida pode ser obtido de duas formas: do tempo em que a intensidade diminui a  $1/e$  do seu valor inicial ou da inclinação do gráfico de  $\log I(t)$  versus  $t$  (Figura 2.23).

Mas, decaimentos de intensidade são tipicamente ajustados por multi-exponenciais

$$I(t) = \sum_{i=1}^n \alpha_i \exp(-t / \tau_i) \quad (2.30)$$

onde  $\tau_i$  são os tempos de decaimento,  $\alpha_i$  representam as amplitudes das componentes em  $t=0$ , e  $n$  é o número de tempos de decaimento. A  $\sum \alpha_i$  é normalizado e igual a 1.

Muitas amostras que contêm apenas um fluoróforo apresentam decaimentos mais complexos que uma exponencial simples. Assim, é necessário explicar os múltiplos tempos de decaimento. Se a sonda pode se apresentar em dois ambientes, tais como exposta ou blindada da água, cada tempo de decaimento pode ser associado a cada um desses estados [67].

É razoável assumir que o fluoróforo com mais de um tempo de decaimento tenha a mesma taxa de decaimento radiativo em cada ambiente. Os fatores pré-exponenciais  $\alpha_i$  representam a fração de moléculas em cada uma das conformações em  $t=0$ , o qual corresponde ao estado fundamental de equilíbrio.

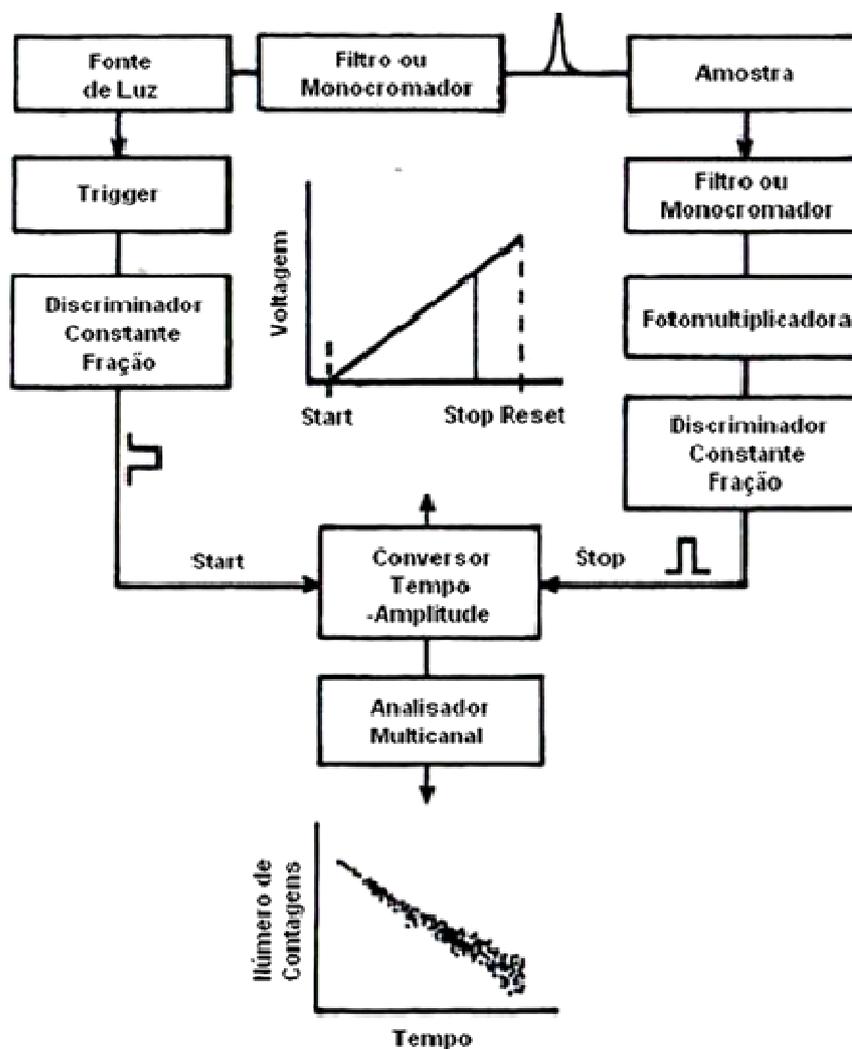
Os valores de  $\alpha_i$  e  $\tau_i$  podem ser utilizados para determinar a contribuição relativa de cada tempo de decaimento para a intensidade de estado estacionário.

$$f_i = \frac{\alpha_i \tau_i}{\sum_j \alpha_j \tau_j} \quad (2.31)$$

O método de contagem de fótons únicos correlacionados no tempo (em inglês, *Time-Correlated Single Photon Counting*, TCSPC), é ilustrado na Figura 2.24. O experimento se inicia com o pulso de excitação, que excita a amostra e inicia a contagem do tempo. A TCSPC é uma técnica digital, contando fótons que estão temporalmente correlacionados com o pulso de excitação. A essência do método é o conversor tempo-amplitude (sigla em inglês, TAC), que pode ser considerado um análogo de um cronômetro rápido.

A amostra é repetidamente excitada usando uma fonte de pulso de luz de um laser. Cada pulso é opticamente monitorado por uma fotomultiplicadora, para produzir um sinal de partida que é usado como gatilho para a rampa de voltagem do TAC. A rampa de voltagem é interrompida quando o primeiro fóton fluorescente proveniente da amostra é detectado. O TAC fornece um pulso de saída cuja voltagem é proporcional ao tempo entre os sinais de partida e de interrupção. Um analisador multicanal (sigla em inglês, MCA) converte essa voltagem para um canal de tempo usando um conversor analógico-digital (sigla em inglês, ADC). Somando sobre vários pulsos, o MCA constrói um histograma de probabilidades de contagens em função dos canais de tempo. O experimento transcorre até atingir um pico de 10.000 contagens no canal do pico. Deve haver não mais que um fóton detectado por 100 pulsos do laser. Sob essas condições, o histograma dos tempos de chegada dos fótons representa o decaimento da intensidade da amostra.

A eletrônica para a TCSPC permite a detecção somente do primeiro fóton que chegam. Uma vez que o primeiro fóton é detectado, o tempo morto na eletrônica impede a detecção de outro fóton resultante do mesmo pulso de excitação.



**Figura 2.24:** Esquema para a medida pelo método TCSPC. Adaptado de: [67].

A função de resposta do instrumento, chamada de lâmpada, é a resposta do instrumento para uma amostra de tempo de vida zero. Essa curva é obtida utilizando uma solução espalhadora, como a água. Esse decaimento representa o perfil do tempo de vida mais curto que pode ser medido pelo instrumento. A lâmpada tem uma largura à meia altura que caracteriza a função.

Se a curva de decaimento, dada na escala logarítmica, é uma reta, isso indica que o decaimento tem um único tempo. O ajuste da curva é feito a partir da convolução da lâmpada com a função de resposta.

### 2.4.6 Decaimento da Anisotropia

Um exemplo da utilização de medidas resolvidas no tempo é o decaimento da anisotropia. Os movimentos rotacionais do fluoróforo podem ser medidos através do decaimento da anisotropia. Para uma molécula esférica, espera-se um único tempo de decaimento para a anisotropia, o qual é chamado de tempo de correlação rotacional ( $\theta$ )

$$r(t) = r_0 \exp(-t/\theta) \quad (2.32)$$

onde  $r_0$  é a anisotropia em  $t=0$ , e é uma característica do fluoróforo. O tempo de correlação rotacional  $\theta$  é o tempo para que a anisotropia decaia a  $1/e$  do seu valor inicial e é maior para fluoróforos ligados a partículas maiores. Quando o fluoróforo pode ser encontrado em forma de monômeros e ligado a partículas maiores, o decaimento da anisotropia será uma dupla exponencial

$$r(t) = r_0 f_M \exp(-t/\theta_M) + r_0 f_A \exp(-t/\theta_A) \quad (2.33)$$

onde  $f_i$  representa a fração do fluoróforo em cada uma das formas, sendo  $f_M + f_A = 1,0$ .

Os decaimentos de anisotropia podem ser mais complexos e são tipicamente apresentados como uma soma de exponenciais

$$r(t) = \sum_j r_{0j} \exp(-t/\theta_j) \quad (2.34)$$

Apesar das formas matemáticas dos decaimentos de intensidade e de anisotropia serem similares, não há relação direta entre os tempos de decaimento e de correlação rotacional. Os tempos de decaimento estão relacionados às propriedades espectrais do fluoróforo, enquanto os tempos de correlação rotacional são determinados pelo tamanho, forma e flexibilidade das partículas onde o fluoróforo se encontra [67].

Se o fluoróforo é excitado com um pulso de luz verticalmente polarizado e rotaciona com um único tempo de correlação rotacional, o decaimento da anisotropia é determinado pela medida do decaimento das componentes verticalmente e horizontalmente polarizadas da emissão. Se a anisotropia fundamental é maior que zero ( $r_0 > 0$ ), o pulso de excitação verticalmente polarizado resulta em uma população inicial de fluoróforos excitados na orientação paralela. A diferença de decaimento entre  $I_{\parallel}(t)$  e  $I_{\perp}(t)$ , quando normalizados pela intensidade total, é o decaimento da anisotropia.

A intensidade total para uma amostra é dada por  $I_T = I_{\parallel} + 2I_{\perp}$ . Da mesma forma, o decaimento de intensidade total sem rotação é

$$I(t) = I_{\parallel}(t) + 2I_{\perp}(t) \quad (2.35)$$

No domínio do tempo, medem-se os decaimentos dependentes do tempo dos componentes polarizados da emissão. Os decaimentos de intensidade polarizados são usado para calcular a anisotropia dependente do tempo

$$r(t) = \frac{I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)}{I_{\parallel}(t) + 2I_{\perp}(t)} \quad (2.36)$$

Na análise dos decaimentos de anisotropia, o valor de  $r_0$  pode ser considerado um valor conhecido ou desconhecido. Se o valor de  $r_0$  é conhecido, a lei de decaimento da anisotropia pode ser escrita como

$$r(t) = r_0 \sum_j g_j \exp(-t / \theta_j) \quad (2.37)$$

onde  $g_j$  são as frações de amplitude que decaem com tempo de correlação  $\theta_j$ . Como  $\sum g_j = 1,0$ ; um valor conhecido de  $r_0$  reduz para 1 o número de parâmetros variáveis. Nessa análise, a anisotropia no tempo zero é forçada a ser igual à  $r_0$ .

A anisotropia total pode ser um parâmetro variável e dado pela Equação (2.34), com  $r_{0j}$  sendo as frações da anisotropia que decaem com tempos de correlação  $\theta_j$ . Nesse tipo de análise a anisotropia no tempo zero é  $r(0)$ .

Dependendo do tamanho e do formato do fluoróforo, e do seu ambiente local, vários tipos de decaimento de anisotropia são possíveis. Uma molécula esférica apresenta um único tempo de correlação rotacional, mas os decaimentos de anisotropia podem ser mais complexos se o fluoróforo não é esférico, levando-nos a imaginar diferentes taxas rotacionais em torno de cada eixo. Para esse caso, espera-se que a anisotropia decaia como uma soma de exponenciais, como dado na Equação (2.34) sendo que na prática pode-se distinguir até três tempos de correlação rotacional.

Decaimentos da anisotropia podem ser usados para caracterizar membranas biológicas modelo. A idéia básica consiste em comparar a anisotropia observada com a sonda ligada na membrana com aquela observada para a sonda em soluções com viscosidade conhecida.

Em temperaturas maiores, acima da fase de transição da membrana, a anisotropia para tempos longos,  $r_{\infty}$ , tende a zero. É importante interpretar o valor da anisotropia limite  $r_{\infty}$ , que pode ajudar na interpretação das propriedades das membranas responsáveis pela rotação dificultada. Um valor de  $r_{\infty}$  diferente de zero demonstra a existência de uma barreira à rotação. Esse parâmetro está relacionado ao parâmetro de ordem, descrevendo a distribuição da orientação de equilíbrio da sonda em tempos muito maiores que o tempo de correlação rotacional.

## CAPÍTULO 3. METODOLOGIA

### 3.1 Condições Experimentais

Durante os experimentos, a temperatura foi controlada. Para os experimentos com solução tampão, foram feitas medidas à temperatura ambiente,  $T = (25 \pm 2)^\circ\text{C}$  ou à temperatura corporal humana,  $T = (36 \pm 1)^\circ\text{C}$ . As medidas feitas com a presença de vesículas foram feitas acima da temperatura de transição do lipídio utilizado. No caso do DMPC, como a temperatura de transição é de  $23^\circ\text{C}$ , foi possível fazer medidas também à temperatura de  $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ , enquanto com o DPPC, que tem a temperatura de transição igual a  $41^\circ\text{C}$ , as medidas foram feitas a  $(47 \pm 3)^\circ\text{C}$ .

O tampão fosfato foi preparado com 10,45 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (fosfato de sódio dibásico heptahidratado) e 1,52 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (fosfato de sódio monobásico) para 500 mL de água milli-Q, obtendo uma concentração de 0,1 M. Para as medidas o tampão foi diluído 10 vezes para obter uma concentração de 10 mM. O pH do tampão obtido é igual a  $7,4 \pm 0,1$ .

As soluções foram preparadas com tampão fosfato, a uma concentração de 10 mM, com pH 7,4, próximo ao pH fisiológico. Para variar a força iônica foi utilizado NaCl na concentração de 150 mM.

### 3.2 Materiais

Os derivados fluorescentes da miltefosina foram obtidos no laboratório do Prof. U. Acuña, do Instituto de Química-Física “Rocasolano”, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Espanha, com quem mantemos colaboração. A amostra enviada era sólida, e foi conservada a temperaturas de  $-20^\circ\text{C}$  ao abrigo de luz. De acordo com o laboratório que sintetizou o análogo, é solúvel nos mesmos solventes que o fosfolipídio original. A pureza, testada por TLC (*Thin Layer Chromatography*) apresentando uma única mancha, e HPLC (*Highperformance Liquid Chromatography*) com um sinal único, testado em vários

comprimentos de onda, é de aproximadamente 99%. Os dados do espectro de  $^1\text{H}$  NMR (*Nuclear Magnetic Resonance* do hidrogênio) condizem com a estrutura. A análise elementar indica a presença de 3,5 moléculas de água por molécula do análogo, as quais não são eliminadas pelos processos padrão de secagem. As propriedades espectroscópicas básicas medidas previamente pelo grupo responsável pela síntese estão citadas no capítulo anterior. A sonda Ahba derivada do ácido aminobenzóico (Abz) foi obtida em laboratório da Unifesp. Os lipídios foram adquiridos no mercado da *Avanti Polar Lipids*.

### 3.3 Preparação das Vesículas de Lipídios

Para a preparação das vesículas unilamelares grandes (em inglês, LUVs) utilizadas no trabalho, foi utilizado o método de extrusão [58], com o *Mini-Extruder Avanti*. A preparação das vesículas foi feita a temperaturas elevadas, acima da transição de fase de cada lipídio utilizado.

Para isso, é necessário preparar um filme lipídico a partir de uma solução de clorofórmio de lipídios, seca em um fluxo de  $\text{N}_2$  e colocada em uma bomba de vácuo por pelo menos 2 horas, para eliminação dos resíduos de solvente orgânico que restam da evaporação [68]. Para a preparação da solução com vesículas, o filme é ressuspenso com a adição de tampão, resultando em uma concentração de 1 mM, e agitado. A suspensão lipídica deve ser mantida acima da temperatura de transição de fase gel-fluido do lipídio durante a hidratação e a extrusão [69]. Com a amostra hidratada, a solução é colocada em uma seringa em um dos lados do mini-extrusor, e do outro lado é colocada uma seringa vazia. Então a seringa que contém a solução é pressionada, para passar pela membrana de policarbonato com os poros com o diâmetro desejado, no caso de 0,1  $\mu\text{m}$ , até ser totalmente transferida para a outra seringa. Na sequência, a solução é transferida novamente para a primeira seringa. Esses dois últimos passos são repetidos no mínimo 4 vezes, para que a solução passe pela membrana 10 vezes. Quanto mais passagens pela membrana, mais homogênea se torna a solução lipídica. A última extrusão deve preencher a segunda seringa, para reduzir a contaminação com as partículas maiores da filtração inicial. A seringa é removida e a solução extrusada é colocada no recipiente de interesse. Durante o experimento, o preparo de vesículas deve ser mantido acima da temperatura de transição do lipídio. Suspensões de vesículas unilamelares com baixa

polidispersidade podem ser preparadas somente com membranas com poro menor ou igual a  $0,2 \mu\text{m}$ . Nesse trabalho foram utilizadas membranas com poros de  $0,1 \mu\text{m}$ .

### 3.4 Medidas de Espectroscopia de Absorção

As medidas realizadas em um espectrofotômetro envolvem uma fonte de luz que emite luz com diversos comprimentos de onda e um monocromador que seleciona e transmite a luz em um comprimento de onda determinado. A luz monocromática atravessa, então, a amostra contida em uma cubeta com caminho óptico  $l$  e é absorvida pela amostra proporcionalmente à concentração das espécies absorventes. A intensidade da luz transmitida é medida por um detector.



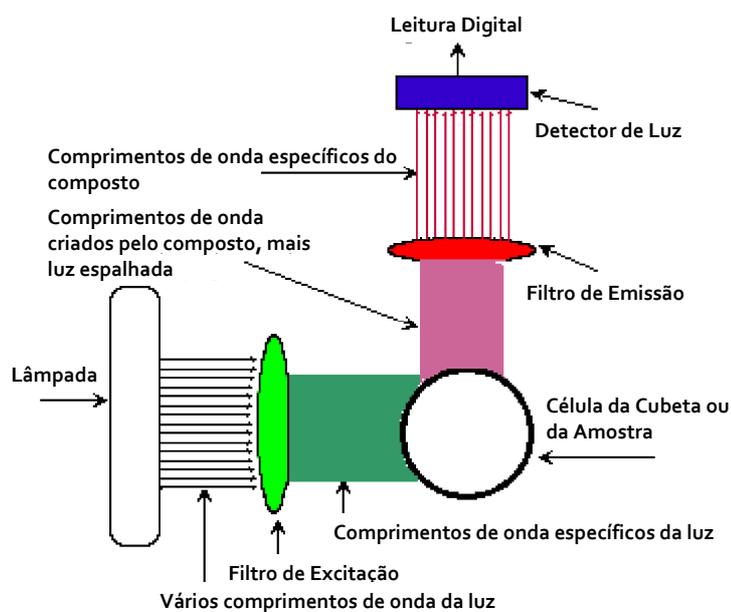
**Figura 3.1:** Espectrômetro *Ultraspec 2100 pro*.

O equipamento utilizado para as medidas de espectroscopia de absorção é o espectrômetro *Amersham Ultraspec 2100 pro* (Figura 3.1), do laboratório de Fotobiofísica do Departamento de Física e Matemática (DFM) da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP) na Universidade de São Paulo (USP). Esse equipamento permite medidas em intervalos de 190 à 900 nm de comprimentos de onda, com largura de banda de 3 nm, e intervalos de absorbância de -3,000 à 3,000.

### 3.5 Medidas de Espectroscopia de Fluorescência

Esquemáticamente um espectrofluorímetro, ilustrado na Figura 3.2, possui uma fonte de luz que produz um espectro de energia amplo. O feixe produzido atinge o monocromador de excitação, que transmite luz seletivamente em um intervalo estreito centrado em um

comprimento de onda específico. A luz transmitida passa através de fendas ajustáveis que controlam a magnitude e a resolução limitando a luz transmitida. A luz filtrada passa na célula da amostra originando emissão fluorescente dos fluoróforos dentro da amostra. A luz emitida entra no monocromador de emissão, posicionado a um ângulo de  $90^\circ$  do caminho da luz de excitação para eliminar o sinal de fundo e minimizar ruídos devido a luz que não foi absorvida. A luz emitida é então transmitida em um intervalo estreito centrado em um comprimento de onda específico e sai através de fendas ajustáveis, entrando, finalmente, no tubo fotomultiplicador (sigla em inglês, PMT), onde o sinal é amplificado e é criada uma voltagem proporcional à intensidade emitida. O PMT é a primeira fonte de ruído no processo de contagem. A resolução espectral e a razão sinal ruído estão diretamente relacionadas às aberturas escolhidas das fendas.



**Figura 3.2:** Esquema de um equipamento para medida de espectroscopia de fluorescência, em formato L.

O espectro de excitação é determinado pela medida da intensidade de emissão em um comprimento de onda fixo enquanto o comprimento de onda de excitação varia. O espectro de emissão é determinado pela medida da variação do comprimento de onda de emissão para um comprimento de onda de excitação fixo.

Em geral, a intensidade de fluorescência diminui com o aumento da temperatura devido ao aumento das colisões moleculares que ocorrem com maior frequência em temperaturas

maiores. A temperatura do compartimento da amostra no equipamento deve ser controlada por um banho com água circulante.

Para evitar o efeito de filtro interno nas medidas de fluorescência, foram utilizadas cubetas com caminho óptico igual ou menor que 10 mm.

As medidas de fluorescência também foram realizadas no DFM, em um espectrofluorímetro *Hitachi F-7000* (Figura 3.3), com uma lâmpada de xenônio de 150 W como fonte de luz varrendo o intervalo de comprimentos de onda de excitação e emissão de 200 à 750 nm.



**Figura 3.3:** Espectrofluorímetro *Hitachi F-7000*.

Foram feitas medidas dos espectros de emissão e de excitação da fluorescência e os dados foram analisados para determinação das posições dos máximos de emissão e excitação, bem como das variações na intensidade de fluorescência.

Medidas de anisotropia de fluorescência foram feitas no mesmo espectrofluorímetro *Hitachi F-7000* usando acessório com filmes polarizadores nos feixes de excitação e de emissão. As medidas de anisotropia de fluorescência no estado estacionário foram repetidas de três a cinco vezes para cada amostra, e o valor de anisotropia utilizado foi o da média  $\pm$  desvio-padrão para o comprimento de onda de máxima emissão.

### 3.5.1 Tempo de Decaimento da Fluorescência

Para medidas com resolução temporal, o laboratório possui um sistema baseado no método de correlação temporal de fótons únicos, em que a fonte de excitação é um laser pulsado *Tsunami 3950* (*Spectra Physics*) de titânio-safira (*Ti:sapphire*) bombeado por laser de estado sólido *Millenia Xs* (*Spectra Physics*) (Figura 3.4).

O laser de estado sólido tem uma saída com potência máxima de 10W no comprimento de onda de 532 nm, verde. É bombeado por diodo *FCbar<sup>TM</sup>*. O meio de ganho é o Nd:YVO<sub>4</sub>. O cristal dobrador é de triborato de lítio (LBO), com tecnologia QMAD.

A frequência dos pulsos gerados no *Tsunami* foi ajustada por um *Pulse Picker 3986* (*Spectra Physics*). A saída do laser é dada entre 855 e 900 nm. O comprimento de onda pode ser escolhido com o auxílio de geradores de harmônicos, como o *Flexible Harmonic Generator (FHG)* da *Spectra Physics*, que podem dobrar ou triplicar a frequência. O pulso de excitação é direcionado para o espectrômetro *Edinburgh FL900* com configuração em formato-L. O comprimento de onda de emissão é selecionado por um monocromador e os fótons emitidos são detectados por uma fotomultiplicadora refrigerada *Hamamatsu C4878* e são correlacionados temporalmente com os pulsos de excitação por meio de um conversor tempo-amplitude. A largura à meia altura da função de resposta do instrumento é tipicamente 0,2 à 0,5 ns. As medidas foram feitas com uma resolução temporal de 0,024 ns por canal. O *software F900* fornecido pela *Edinburgh Instruments* foi utilizado para análise inicial dos dados de decaimento. A inspeção do ajuste dado pelo *software* foi feita pela observação dos gráficos dos resíduos e do parâmetro estatístico  $\chi^2$  (*chi-square*) reduzido.



**Figura 3.4:** Lasers *Tsunami* e *Milennia* utilizados nos experimentos de fluorescência com resolução temporal.

Para as medidas de anisotropia com resolução temporal foi utilizado um compensador *Babinet-Soleil BSC100* da *Halbo Optics* no feixe de excitação e um polarizador *P920* da *Edinburgh Instruments* de prisma *Glan-Tompson* no feixe de emissão.

### 3.6 Medida de Tensão Superficial: Método da Gota Pendente

Para as medidas com o método da gota pendente, foi utilizado o *Tensiômetro OCA 20* (*Optical Contact Angle Measuring Instrument*), da *DataPhysics*, Alemanha (Figura 3.5), pertencente ao Laboratório de Físico-Química do Departamento de Química da FFCLRP-USP, e a análise foi feita com o *Software SCA* da *DataPhysics*.



**Figura 3.5:** Equipamento *OCA-20* para medida de tensão superficial pelo método da gota pendente [70].

O equipamento calcula a tensão superficial de acordo com as seguintes etapas: obtenção do perfil experimental da imagem da gota, binarização da imagem, extração do perfil da imagem da gota (Figura 3.6), cálculo do fator de forma  $B$ , resolução da Equação de Laplace-Young adimensional, cálculo do raio de curvatura  $R_l$ , otimização, e, finalmente, cálculo da tensão superficial.

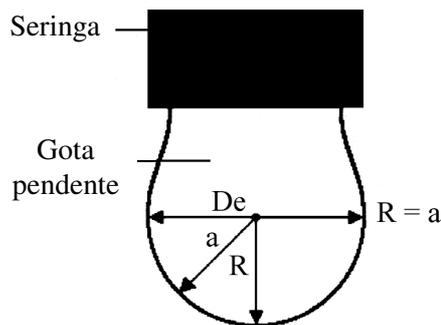


**Figura 3.6:** Exemplo de imagem da gota pendente que é utilizada pelo *software* para o cálculo da tensão superficial da gota.

As etapas são descritas a seguir.

A imagem da gota é capturada pela placa de aquisição com uma resolução da CCD (*charge-coupled device*) no modo CCIR de 768 X 576 pixel usando ferramentas de um *software* comercial. O processamento da imagem pela placa de aquisição *PCI-frame grabber* é de 132 Mbytes por segundo de transferência máxima de dados. A digitalização é de até 50 imagens por segundo.

Então é feita a extração do contorno e a determinação do raio de curvatura no ápice necessário para o cálculo da tensão superficial (Figura 3.7). A distorção da imagem não ultrapassa 0,05%. Um programa de detecção de borda é utilizado após a digitalização da imagem da gota para obter o contorno. O contorno da gota é definido pelo último pixel com um nível de cinza maior que o valor limiar. Para avaliar a tensão superficial usando a Equação (2.5) é necessário conhecer o raio de curvatura no ápice da gota. O valor do raio é dado pela distância entre o ápice e o centro do diâmetro como mostrado na Figura 3.7. Uma vez que a detecção da borda foi realizada, o eixo de simetria é então determinado. Círculos de diferentes raios são sobrepostos ao número máximo de pontos em torno do eixo. O raio do círculo que se superpõe ao máximo de pontos é considerado igual ao raio de curvatura da gota no ápice [61]. O equipamento utilizado mede tensões superficiais e interfaciais no intervalo de 0,01 à (2000  $\pm$  0,05) mN/m

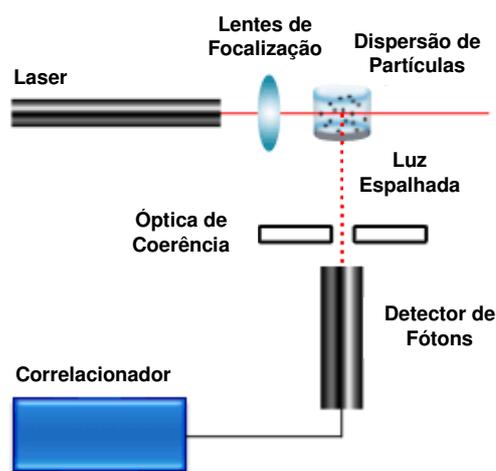


**Figura 3.7:** Obtenção do raio de curvatura no ápice da gota pendente. Fonte: [61].

Foram feitas medidas da cinética da gota em função do tempo, pois o equilíbrio superficial dos monômeros de miltefosina só era atingido em tempos maiores que 1 min.

### 3.7 Medida de Tamanho de Partículas: Espalhamento Dinâmico de Luz

Para as medidas de tamanho dos agregados de miltefosina, foi utilizado o método de espalhamento dinâmico de luz. O equipamento utilizado, um *Zetasizer 3000 HS<sub>A</sub>* da *Malvern Instruments*, pertence ao laboratório de Físico-Química do Departamento de Química da FFCLRP-USP.



**Figura 3.8:** Diagrama esquemático de um equipamento de espalhamento dinâmico de luz de 90° convencional, cujo princípio está na Seção 2.3.

Antes das medidas a amostra foi filtrada em filtro *Millipore* com poro de 0,22  $\mu\text{m}$ .

O objetivo dessas medidas era obter a distribuição do tamanho das partículas, no caso agregados de miltefosina em solução aquosa. A concentração de miltefosina utilizada para os experimentos foi de 2 mM.

## CAPÍTULO 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo estão apresentados os resultados dos experimentos realizados, e a análise dos resultados obtidos com uma posterior discussão.

### 4.1 Agregação da Miltefosina (MT)

A miltefosina (MT) é um detergente zwitteriônico similar aos fosfolipídios presentes nas membranas naturais. Sua molécula apresenta uma “cabeça” zwitteriônica, composta por um grupo fosforil negativo e um grupo colina positivo, e uma cadeia hidrocarbônica com 16 carbonos.

A MT também chamada de hexadecilfosfocolina, assim como a *n*-dodecilfosfocolina, ou DPC, pertence ao grupo das fosfocolinas de cadeia única, as quais herdaram as características vantajosas dos lipídios naturais, e espera-se que possuam a funcionalidade do grupo fosfocolina (sigla em inglês, PC). O grupo PC é idêntico ao dos fosfolipídios, mas a cadeia hidrocarbônica única leva à formação de micelas ao invés de bicamadas. Os surfactantes PC com cadeia única apresentam características vantajosas, como simulação da membrana celular na solubilização de peptídios e proteínas, atividade antifúngica e antibacteriana [53], e atividade anti-leishmania comprovada.

Na literatura, há vários dados disponíveis em relação à cmc da MT, obtidos por métodos diversos e diferentes dos utilizados nesse trabalho. Os valores obtidos por diferentes autores são díspares. Por tensão superficial, usando o método do anel de Du Nouy, o valor obtido para a cmc da MT em água pura a 25°C foi de 12  $\mu\text{M}$  [38]. Pelo método da placa de Wilhelmy, o valor da cmc obtido foi de 10,3  $\mu\text{M}$ , e esse valor era constante no tampão acetato de sódio 50 mM (pH 6,00) e em concentrações de NaCl entre 100 e 250 mM [71, 72]. Em gráficos de pressão superficial máxima das monocamadas de MT em função da sua concentração espalhada na monocamada de Langmuir, o platô corresponde à saturação da superfície por monômeros de MT, e os valores estimados para a cmc estão entre 2 e 2,5  $\mu\text{M}$  na presença de 150 mM de NaCl

na subfase e entre 2,5 e 3  $\mu\text{M}$  na presença de água destilada [12]. Os monômeros de MT são progressivamente inseridos nas monocamadas até a concentração de 2  $\mu\text{M}$ , correspondendo à concentração micelar crítica (cmc) da MT [73]. Observou-se também que a MT forma monocamadas de Langmuir estáveis que quase não são influenciadas pelas condições experimentais [74]. Pelos métodos de fluorescência de solubilização do corante (*fluorescence dye solubilization method*), obteve-se um valor de 160  $\mu\text{M}$  [75] também em água pura à 25°C. Utilizando a técnica da sonda fluorescente esse resultado foi de 32  $\mu\text{M}$  [76].

#### 4.1.1 Medidas de Tensão Superficial

As medidas foram feitas a 25°C, em três meios: em água Milli-Q, em tampão fosfato 10 mM com pH 7,4, e em tampão com adição de 150 mM de NaCl.

Num primeiro momento, as medidas foram feitas formando a gota com a solução da MT em tampão, e eram feitas três medidas em cada concentração, das quais era feita uma média. Um problema observado foi devido à injeção no sistema da solução já contendo a MT, pois pode haver perda devido à adsorção das moléculas de MT no caminho percorrido pela solução até a ponta da agulha onde é formada a gota. Essa perda faz com que a concentração real de MT na gota seja menor que a concentração da solução original, provocando um erro no cálculo da cmc. Esse problema é importante, principalmente porque a cmc da MT é muito pequena, da ordem de poucos micromolares, havendo grande influência devido a pequenos erros de concentração. Para resolver esse problema, o procedimento foi alterado. A gota era formada por uma solução de tampão apenas, e uma solução concentrada de MT era adicionada com uma microseringa na gota de tampão já formada, e como o *software* calcula o volume da gota, é possível calcular a nova concentração de MT na gota após a diluição, a partir da relação

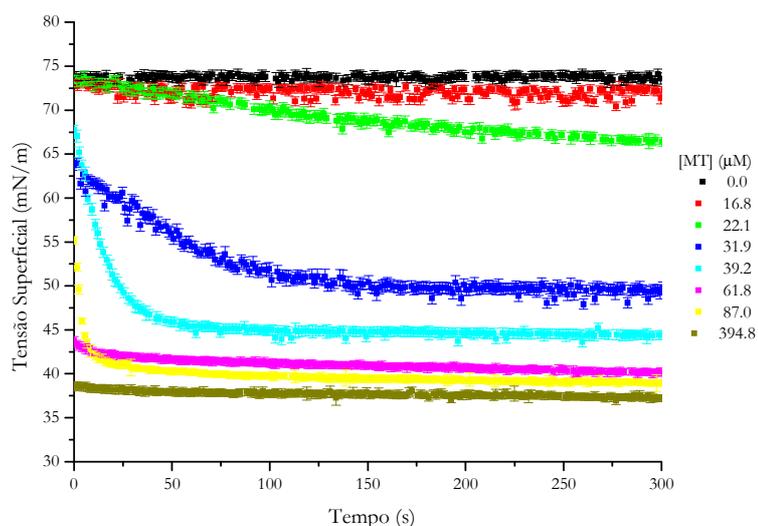
$$C_{inicial}V_{inicial} = C_{final}V_{final} \quad (4.1)$$

sendo  $C_{inicial}$  a concentração da solução concentrada de MT,  $V_{inicial}$  o volume dessa solução adicionado na gota,  $V_{final}$  o volume da gota e  $C_{final}$  a concentração de MT na gota, da qual se está medindo a tensão superficial.

Também foi observado que os valores de tensão superficial medidos logo após a formação da gota iam diminuindo com o tempo, indicando que havia uma dinâmica na adsorção, ou seja, os monômeros de MT não iam imediatamente para a interface da gota, transcorrendo um tempo de poucos minutos para atingir o equilíbrio. Por isso, foram feitas, para cada concentração, medidas da cinética da tensão superficial, ou seja, o valor da tensão era medido ao longo do tempo em intervalos de menos de 2 s até atingir o equilíbrio, quando não variava mais em intervalos grandes de tempo. O tempo para atingir o equilíbrio era em torno de 5 min, isto é, 300 s.

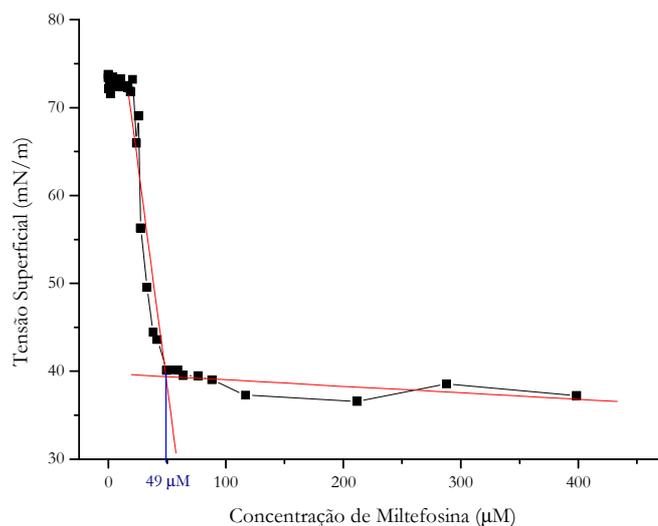
A Figura 4.1 apresenta o gráfico das curvas da cinética da tensão superficial da gota em solução tampão, para algumas das concentrações para as quais foram feitas as medidas, que estão no intervalo de 0 e 400  $\mu\text{M}$ . As curvas apresentam os últimos 300 s medidos. Essas curvas foram feitas para todas as concentrações de MT de interesse, e os experimentos foram realizados com adição de sal e em água Milli-Q.

Os valores de concentração das legendas dos gráficos estão corrigidos para o volume final da gota, quando o equilíbrio é atingido, pois, como o volume da gota é muito pequeno (da ordem de 10  $\mu\text{L}$ ), ele sofre variações dependendo da umidade relativa do ar e da temperatura, e como o valor de tensão superficial é aquele correspondente ao equilíbrio, deve-se conhecer o valor da concentração nos últimos segundos de medida.



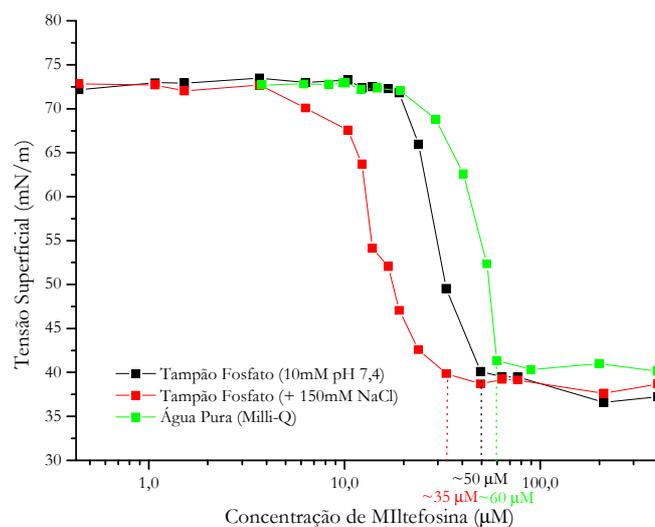
**Figura 4.1:** Gráfico da cinética da tensão superficial da MT em diferentes concentrações em tampão fosfato (10 mM) pH 7,4 à  $T=25^\circ\text{C}$ .

A partir dos gráficos de cinética, é possível encontrar o valor de tensão superficial de equilíbrio. Assim, para cada concentração há um valor de tensão superficial correspondente, e esses pontos compõem o gráfico da Figura 4.2 para a solução em tampão.



**Figura 4.2:** Gráfico da tensão superficial da gota em função da concentração de MT na solução em tampão fosfato (10 mM) pH 7,4 à  $T= 25^{\circ}\text{C}$ , com os ajustes lineares da diminuição da tensão superficial e da tensão superficial constante cuja intersecção resulta na cmc.

Observando os gráficos de tensão superficial em função da concentração de MT, pode-se observar que para concentrações muito baixas o valor da tensão superficial é aproximadamente constante e próximo ao valor obtido para o tampão puro, que, por sua vez, é próximo ao da água, o qual, em  $25^{\circ}\text{C}$  é de aproximadamente  $72 \text{ mN/m}$ . Para uma determinada concentração de MT, a tensão superficial começa a diminuir devido à adsorção dos monômeros de MT na superfície da gota. Essa diminuição da tensão superficial ocorre até que a superfície se sature de monômeros, ou seja, quando os monômeros não adsorvem mais na superfície da gota, não alterando a tensão superficial. Isso se dá quando se inicia a formação agregados micelares no interior da gota. Assim, para determinar a cmc, basta obter o ponto em que a tensão superficial se torna aproximadamente constante, ou, de forma mais rigorosa, o ponto de intersecção das retas de ajuste linear que ajustam os pontos de diminuição da tensão superficial e os pontos de tensão superficial constante.



**Figura 4.3:** Gráfico da tensão superficial da gota em função da concentração de milefosina na solução, em escala logarítmica, com destaque para o valor da cmc da MT nos diferentes meios.

O gráfico da Figura 4.3 mostra as curvas de tensão superficial em função da concentração de MT em escala logarítmica para os diferentes meios, para uma melhor comparação. As linhas pontilhadas indicam o valor da cmc nos três meios. O valor obtido para a cmc da MT utilizando esse método de medida de tensão superficial é de aproximadamente 60  $\mu\text{M}$  em água Milli-Q, 50  $\mu\text{M}$  em tampão fosfato 10 mM (pH 7,4) e 35  $\mu\text{M}$  em tampão com adição de 150 mM de NaCl.

A cmc de surfactantes iônicos diminui com a adição de eletrólitos inertes na solução. O aumento na força iônica devido à adição de eletrólitos aumenta a interação hidrofóbica entre as moléculas de surfactante e induz a formação de micelas a menores concentrações que na água [48]. Esse fenômeno pôde ser observado nos experimentos com adição de NaCl em concentração de 150 mM. A adição do sal pode diminuir a solubilidade da MT, implicando numa maior tendência à formação de micelas, e, por isso, diminuindo a cmc. A diferença entre as curvas para a água Milli-Q e para o tampão ocorre pelo mesmo motivo, já que o tampão contém uma concentração de 10 mM de sais, os quais são ausentes em água Milli-Q.

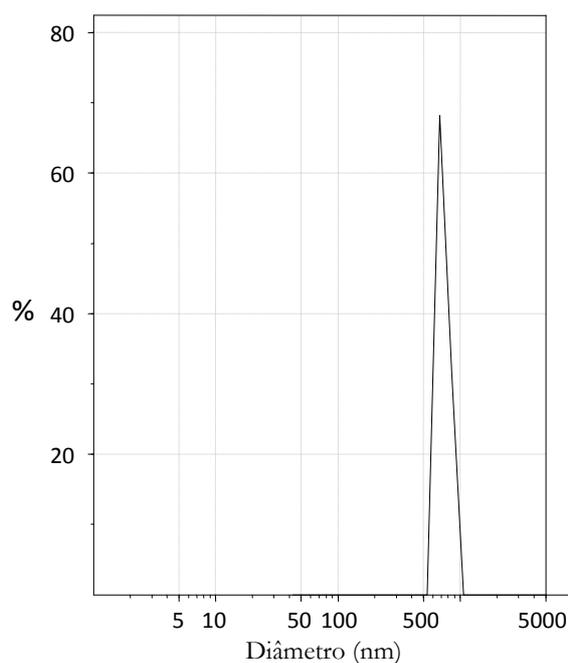
### 4.1.2 Tamanho dos Agregados em Solução Aquosa

Adicionalmente, foram feitas medidas de espalhamento dinâmico de luz, com o objetivo de determinar o tamanho dos agregados de MT formados, para que, a partir dos resultados, fosse possível analisar o tipo de agregado que estaria sendo formado.

Foram obtidos gráficos das distribuições de tamanhos do diâmetro das partículas, as quais foram calculadas a partir de mais de um método entre os disponíveis no *software* do equipamento.

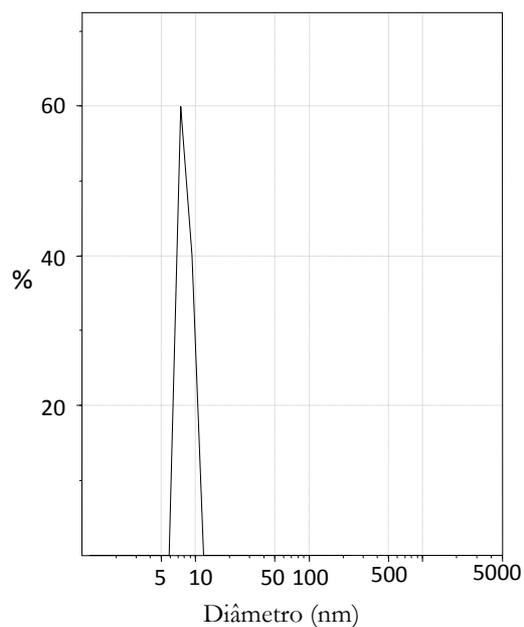
Foi utilizada uma solução de MT com concentração de 2 mM em tampão fosfato.

Primeiramente, a solução foi preparada por diluição do estoque de MT preparado em etanol, resultando em uma distribuição de tamanhos acima de 500 nm, como pode ser observado no gráfico da Figura 4.4.



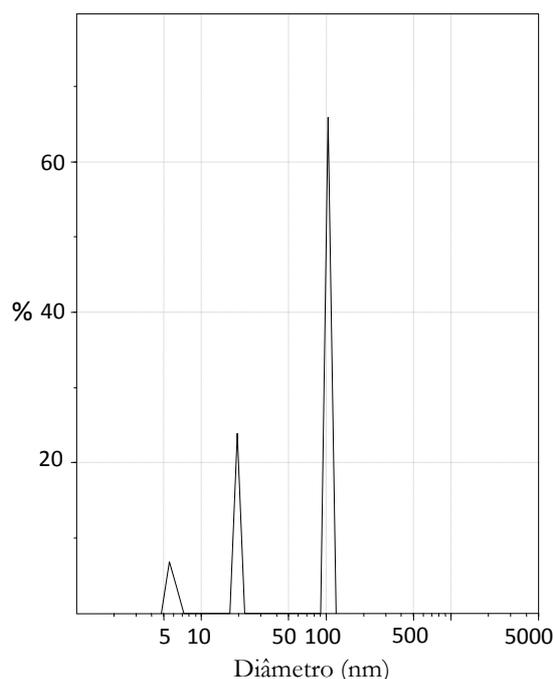
**Figura 4.4:** Distribuição de tamanhos da solução aquosa de MT obtida por medida de espalhamento dinâmico de luz com etanol do estoque, calculada pelo método automático do *software*.

A solução foi então filtrada com um filtro MILLEX com poro de 0,22  $\mu\text{m}$ , eliminando assim impurezas com tamanho superior a 220 nm. Para essa medida foi obtido o gráfico da Figura 4.5, com uma distribuição de tamanhos entre 5 e 10 nm.



**Figura 4.5:** Distribuição de tamanhos da solução aquosa de MT obtida por medida de espalhamento dinâmico de luz com etanol do estoque, após filtragem com poros de 220 nm, calculada pelo método automático do *software*.

Como foi adicionada uma quantidade relativamente grande de etanol na solução tampão (20% v/v), que, por ser um solvente polar no qual a MT é solúvel, interfere na agregação, foi preparada uma solução de MT a partir de um filme no qual o etanol foi seco com um fluxo de nitrogênio. O gráfico dos agregados de MT formados em meio aquoso na concentração de 2 mM (Figura 4.6) apresenta uma distribuição mais intensa em 100 nm, uma segunda intermediária em 20 nm e a terceira em torno de 5 nm.



**Figura 4.6:** Gráfico da distribuição dos diâmetros dos agregados obtida para a solução aquosa de MT 2 mM preparada a partir de um filme de MT, ou seja, sem a presença de etanol, após filtragem da solução com poros de 220 nm, calculada pelo método automático do *software*.

Observando as distribuições da Figura 4.6, observa-se que a maioria dos agregados tem um diâmetro em torno de 100 nm, mas também foram encontrados diâmetros em torno de 5 e de 20 nm. Isso pode sugerir que, para a concentração utilizada nos experimentos, de 2 mM, a qual está bem acima da cmc da MT (da ordem de dezenas de micromolar) há formação de agregados não esféricos, com tamanhos diferentes nas três dimensões, sendo a maior dimensão da ordem de 100 nm, a menor de 5 nm e a terceira de 20 nm.

Utilizando fórmulas empíricas [77] para o cálculo do comprimento da cadeia hidrocarbônica de acordo com o número de carbonos  $n_C$ , a molécula da MT teria um comprimento  $l$  dado por:

$$l = 1,50 + 1,26n_C \text{ \AA} \Rightarrow l = 2,17 \text{ nm} \quad (4.2)$$

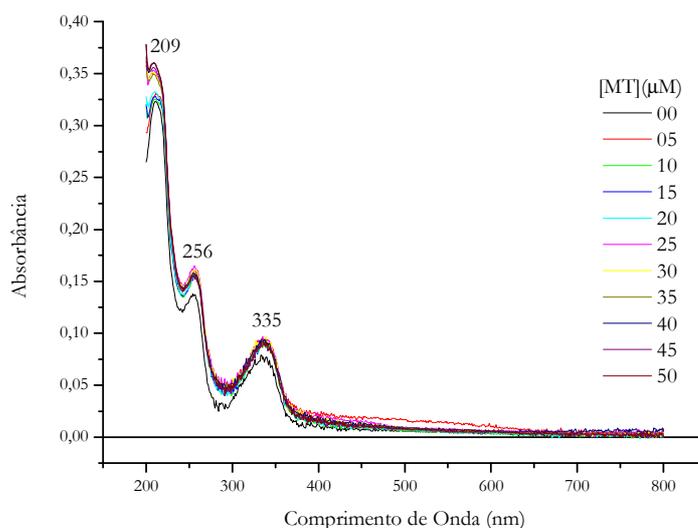
Assumindo um agregado esférico, o diâmetro seria dado pelo dobro do valor de  $l$  que é igual a 4,34 nm. Esse valor corresponde ao menor tamanho obtido nas distribuições de tamanho obtidas por medidas de espalhamento dinâmico de luz com a solução aquosa de MT em concentração com duas ordens de grandeza acima da sua cmc, o que nos leva a concluir que o agregado não é esférico, e que sua menor dimensão equivale ao dobro do comprimento das cadeias hidrocarbônicas da MT.

## 4.2 Espectroscopia da Sonda Ahba com Adição de MT

Nessa seção apresentamos os resultados do monitoramento das características espectroscópicas de absorção e de fluorescência, tanto estática quanto resolvida no tempo, da sonda Ahba em solução com MT, a fim de observar as mudanças provocadas nessas propriedades pela interação da MT com a sonda fluorescente.

### 4.2.1 Absorção

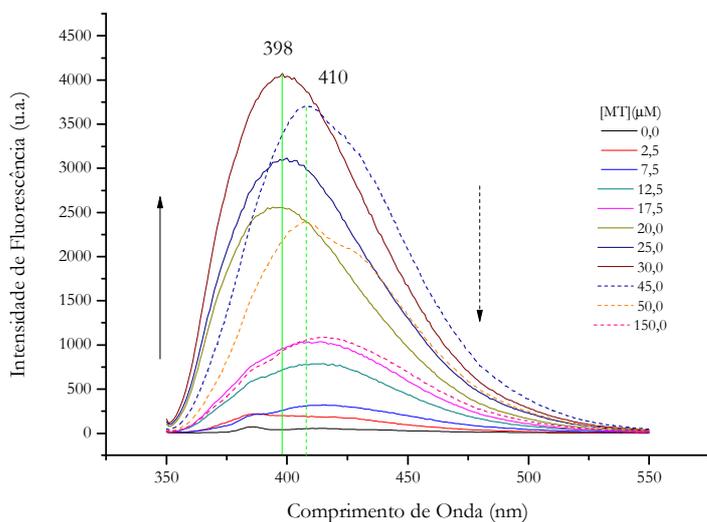
Na Figura 4.7 mostramos espectros de absorção da sonda Ahba na concentração de 20  $\mu\text{M}$  em tampão fosfato 10 mM, pH 7,4, contendo MT em diferentes concentrações à 36°C. A menos de efeitos devido a aumento de espalhamento, visíveis principalmente em comprimentos de onda menores, não se notam grandes alterações nas bandas de absorção da sonda fluorescente, cuja banda mais próxima do visível está centrada em 335 nm, valor que concorda com obtido anteriormente [46]. A característica hidrofóbica da cadeia alifática da sonda Ahba resulta em uma solubilidade em água muito baixa, e o deslocamento da posição da banda de absorção é atribuído à formação de agregados, já que em etanol esse máximo é observado em 316 nm.



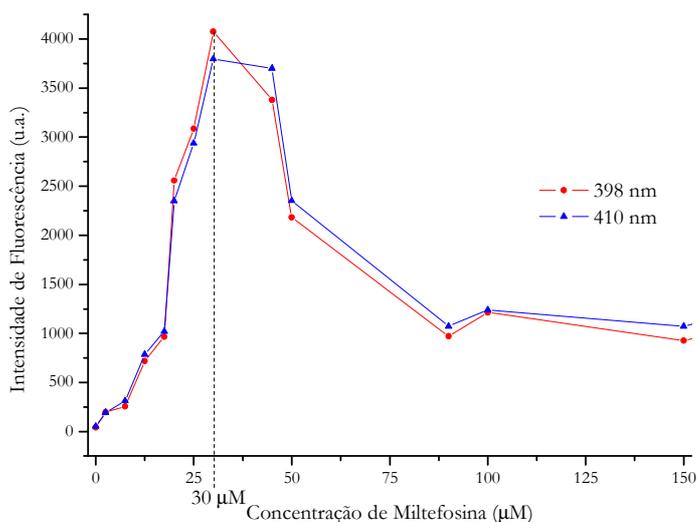
**Figura 4.7:** Espectro de absorção da sonda fluorescente Ahba 20  $\mu\text{M}$  em tampão fosfato 10 mM pH 7,4 à 36°C com acréscimo de MT.

### 4.2.2 Fluorescência

Os espectros de fluorescência obtidos são da sonda Ahba em meio aquoso, a qual tem sinal fraco na ausência de MT devido à auto-supressão que ocorre nos agregados de Ahba. Os monômeros de MT adicionados vão para esses agregados, formando agregados mistos, o que provoca o crescimento do sinal de fluorescência do Ahba (Figura 4.9). Acima de  $30\ \mu\text{M}$  se formam agregados de MT, e a sonda Ahba se dissolve nesses novos agregados, o que provoca o deslocamento evidente do comprimento do máximo de fluorescência (Figura 4.8).



**Figura 4.8:** Espectros de fluorescência da sonda Ahba com adição de MT, em tampão fosfato 10 mM pH 7,4 com adição de 150 mM de NaCl à 25°C.



**Figura 4.9:** Picos de intensidade de fluorescência da sonda Ahba com adição de MT, em tampão fosfato 10 mM pH 7,4 com adição de 150 mM de NaCl à 25°C para os comprimentos de onda de 398 nm e 410 nm.

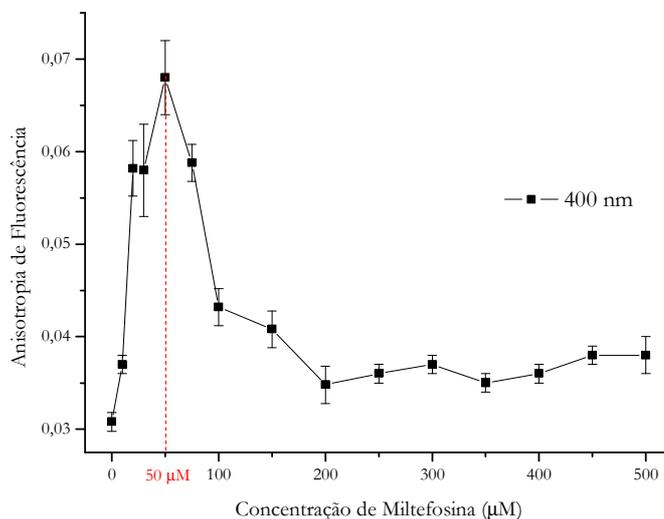
### 4.2.3 Anisotropia de Fluorescência de Estado Estacionário

A determinação fluorimétrica da cmc é baseada em variações no formato das propriedades fotofísicas de uma molécula que interage com o agregado de surfactante [53].

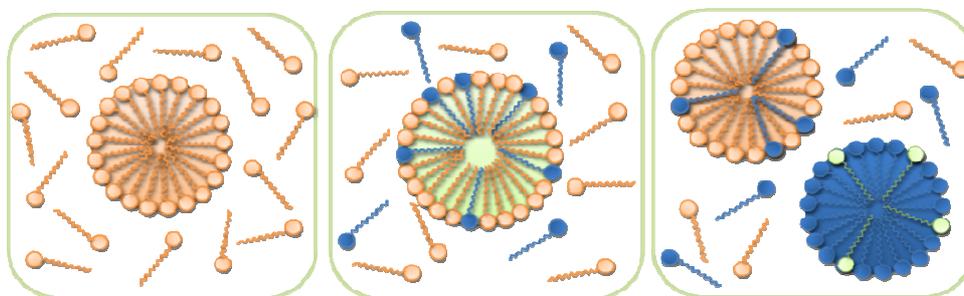
O estoque de Ahba foi preparado em etanol, assim como o de MT. Como seria adicionada uma quantidade muito grande de etanol para obter altas concentrações de MT em solução, o que poderia interferir nas interações e, conseqüentemente, nos resultados, foram preparados filmes de Ahba com a quantidade de MT para obter a concentração em solução requerida, a partir da secagem do etanol utilizando um agitador de tubos e um fluxo de nitrogênio e posterior secagem em uma bomba de vácuo por cinco horas.

Para a construção do gráfico de anisotropia em função da concentração de MT (Figura 4.10) foram utilizados os valores da anisotropia em 400 nm, que é um comprimento de onda próximo ao máximo de emissão do fluoróforo (395 nm). A excitação foi feita em 340 nm. As medidas para cada concentração de MT foram

repetidas cinco vezes, e os pontos observados no gráfico representam a média dessas medidas com seu respectivo desvio-padrão.



**Figura 4.10:** Gráfico da anisotropia de fluorescência da sonda Ahba (20 µM) em tampão fosfato (10 mM) pH 7,4 a 25°C em função da concentração de MT na solução. Excitação = 340 nm, Emissão = 400 nm. Média de 5 medidas.



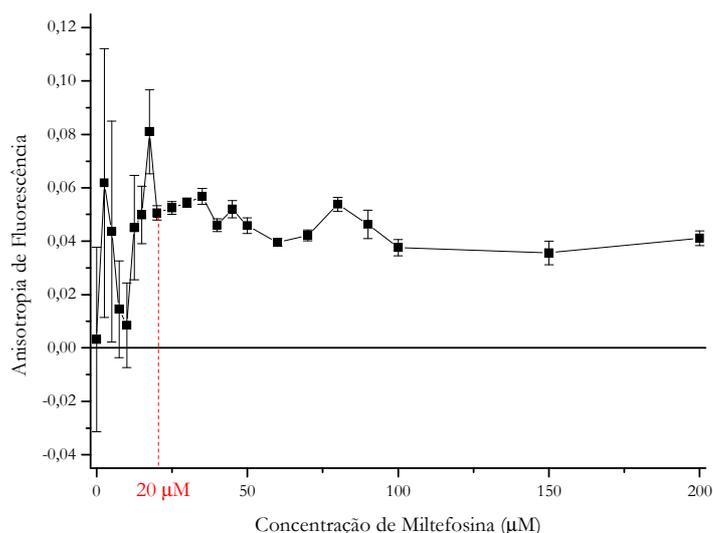
**Figura 4.11:** Esquema de agregação dos monômeros de Ahba (em cor clara) e MT (em cor escura) em uma solução de Ahba com acréscimo de MT em meio aquoso.

O perfil do gráfico da Figura 4.10 pode ser interpretado como segue. No início das medidas, não há MT, e a anisotropia medida corresponde à anisotropia dos agregados de Ahba presentes no meio. Isso porque considera-se que a sonda Ahba agrega em meio aquoso mesmo em concentrações muito baixas [46]. Ao acrescentar pequenas concentrações de MT, abaixo da cmc, os monômeros vão para os agregados de Ahba, já que a MT é uma molécula anfifílica e sua cauda hidrofóbica tem afinidade por agregados em solução aquosa a fim de evitar o contato com a água (Figura 4.11). Com isso, os agregados de Ahba com monômeros de MT vão aumentando de tamanho, o que

provoca uma diminuição na sua mobilidade e um conseqüente aumento da anisotropia de fluorescência. Quando é acrescida uma concentração de MT em torno do valor da cmc, começam a se formar agregados de MT, e os monômeros que iriam para os agregados de Ahba começam a formar as micelas de MT, diminuindo novamente o tamanho dos agregados de Ahba, e, conseqüentemente, diminuindo a anisotropia de fluorescência. A partir de uma determinada concentração, há um equilíbrio dinâmico entre os monômeros de MT em solução, os monômeros de MT nos agregados de Ahba, e as micelas de MT, tornando o valor da anisotropia aproximadamente constante. Assim, observando o pico do gráfico na Figura 4.10, pode-se concluir que o valor da cmc da MT obtido por esse método, é de aproximadamente 50  $\mu\text{M}$ .

Esse resultado é importante, pois, em tampão, os valores de cmc obtidos, tanto utilizando o método de medida da anisotropia de fluorescência da sonda Ahba em presença de MT quanto o método de medida da tensão superficial da gota com adição de MT, são iguais, indicando que esse deve ser o valor real da cmc da MT.

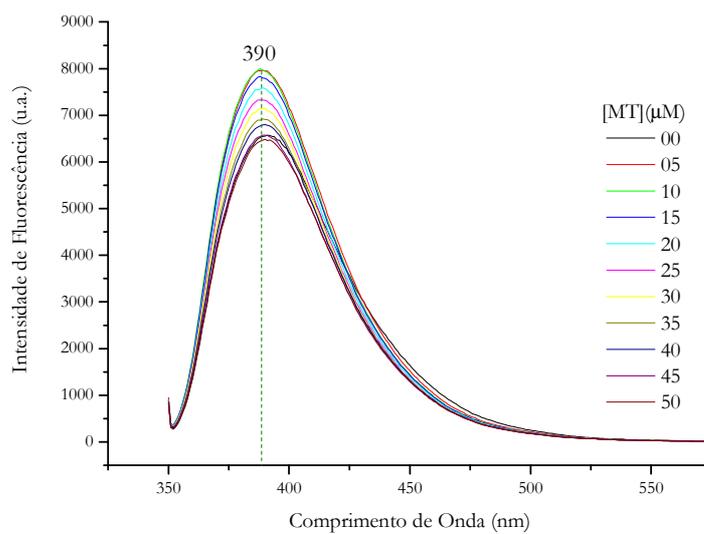
Foram feitas medidas de anisotropia em tampão fosfato contendo 150 mM de NaCl (Figura 4.12). Os dados indicam a ocorrência de alterações em concentrações próximas de 20  $\mu\text{M}$ , seguindo a mesma tendência de diminuição da cmc devido a adição de sal, o valor encontrado a partir do método da gota pendente é de 35  $\mu\text{M}$ .



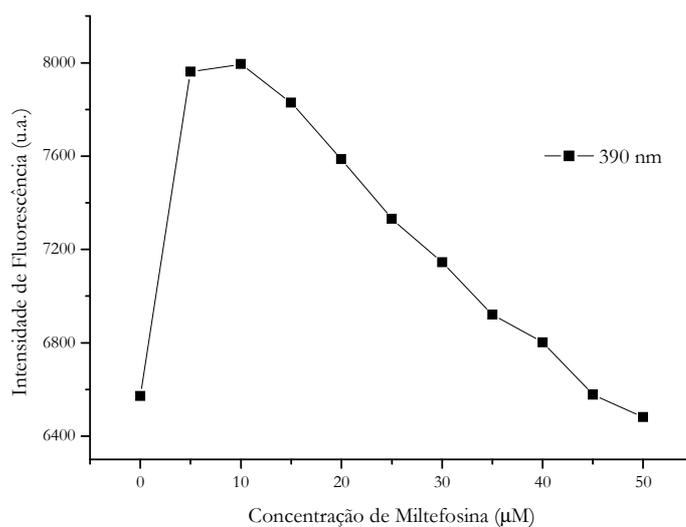
**Figura 4.12:** Gráfico da anisotropia de fluorescência da sonda Ahba em função da concentração de MT na solução de tampão fosfato (10 mM) pH 7,4 com adição de 150mM de NaCl a 25°C.

#### 4.2.4 Efeitos de Temperatura

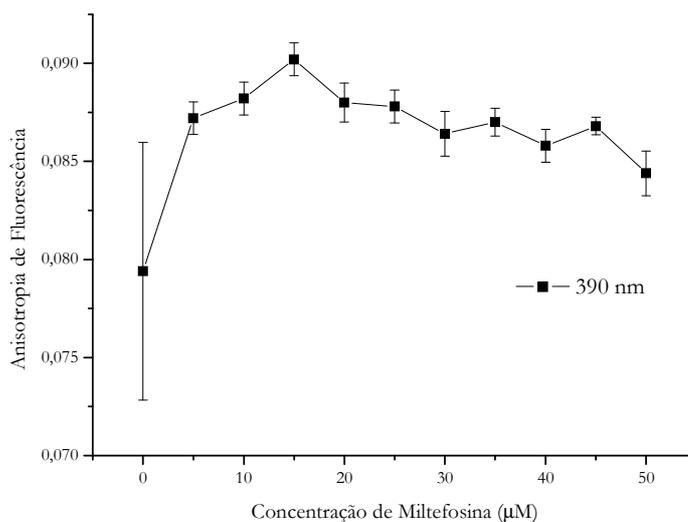
Os experimentos de espectroscopia de fluorescência foram realizados também em 36°C, para avaliar o efeito da temperatura nas interações da MT com a sonda Ahba em meio aquoso.



**Figura 4.13:** Espectros de fluorescência da sonda Ahba com adição de MT em tampão fosfato 10 mM pH 7,4 a 36°C.



**Figura 4.14:** Máximo da intensidade de fluorescência em tampão fosfato 10 mM pH 7,4 à 36°C em função da concentração de MT.



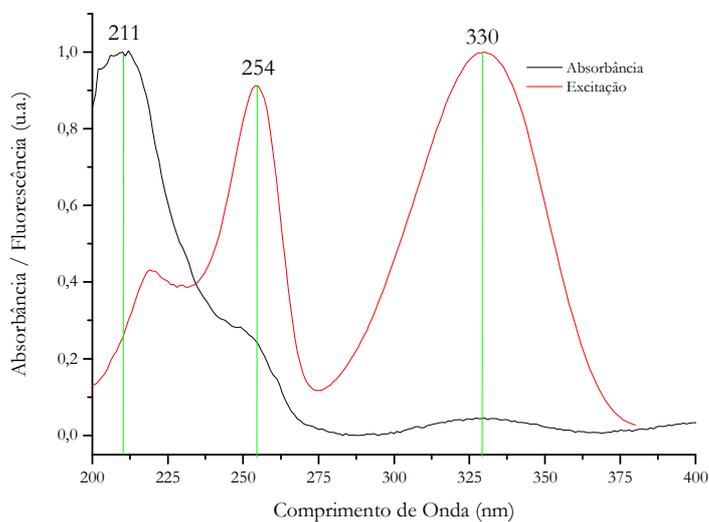
**Figura 4.15:** Gráfico da anisotropia de fluorescência da sonda Ahba em função da concentração de MT na solução de tampão fosfato 10mM pH 7,4 à 36°C.

Observando os espectros da Figura 4.13 e o gráfico da Figura 4.14, aparentemente há uma diminuição da quantidade de agregados da sonda Ahba, pois o sinal de fluorescência é intenso mesmo para baixas concentrações de MT. Já a anisotropia de fluorescência, observada em função da adição de mitlefosina na Figura 4.15, é alta, e praticamente não varia com o aumento da concentração de MT, indicando que possa haver uma menor influência da auto-supressão. Pode-se concluir, a partir desses dados, que a sonda fluorescente Ahba, devido ao efeito de auto-supressão, não é um bom indicador da cmc da MT.

#### 4.2.5 Ahba e Interação da MT com Sistemas com Vesículas

Foram feitas medidas da absorbância da sonda Ahba em solução com vesículas. As medidas de absorção são influenciadas pelo espalhamento da luz, principalmente em comprimentos de onda menores e para partículas espalhadoras maiores, que é o caso das vesículas de fosfolipídios, as quais foram preparadas com diâmetros de 100 nm. Na Figura 4.16, está apresentado o espectro de absorção normalizado, e, para comparação, foi feito o espectro de excitação normalizado da sonda Ahba, com emissão em 400 nm,

o máximo de emissão da sonda. Pode-se observar o efeito de aumento da absorbância em menores comprimentos de onda.

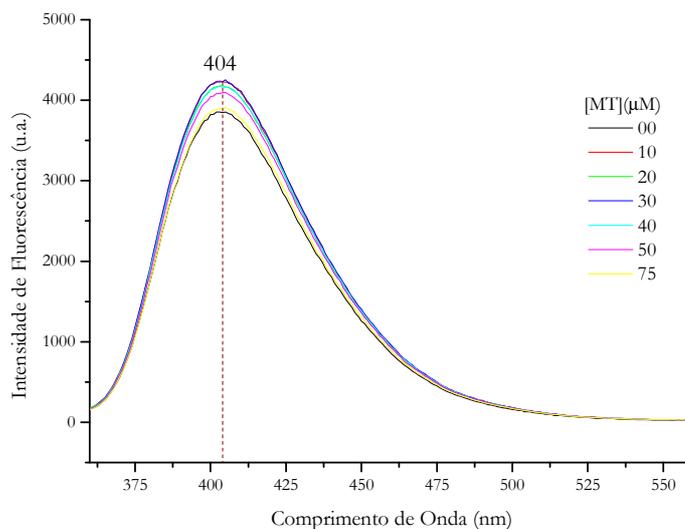


**Figura 4.16:** Espectros de absorção e de excitação da sonda fluorescente Ahba 20  $\mu\text{M}$  em solução com vesículas de DPPC (1 mM) à 50°C, normalizados.

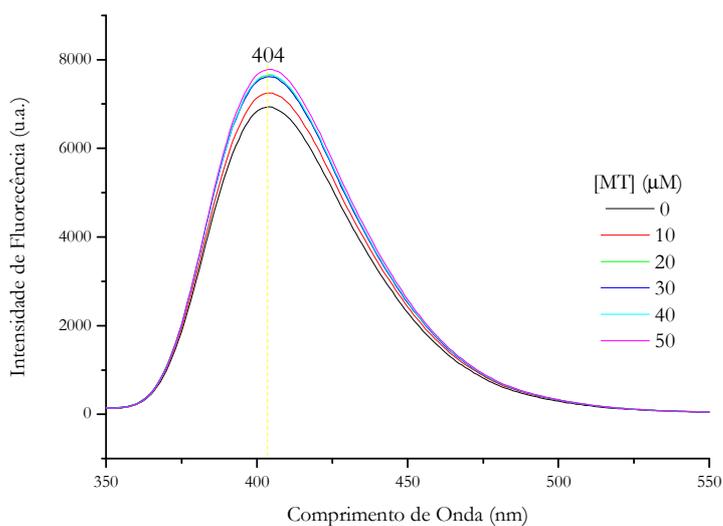
### Espectros e Anisotropia Estática

Para avaliar os efeitos da MT sobre membranas modelo, realizamos experimentos em que examinamos as alterações nas propriedades fluorescentes da sonda lipofílica Ahba incorporada em vesículas de fosfolipídios (DMPC ou DPPC), com o acréscimo de MT.

Os espectros de fluorescência da sonda, com excitação em 330 nm, não registram mudanças na forma da banda nem na posição espectral do máximo de emissão (Figura 4.17 e Figura 4.18)

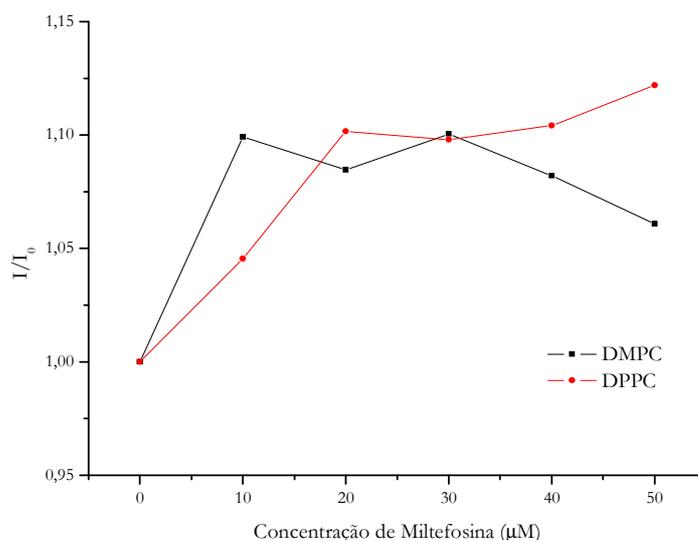


**Figura 4.17:** Espectros de fluorescência da sonda Ahba (20 μM) em solução tampão fosfato (10 mM) pH 7,4 contendo vesículas de DMPC (1 mM), com acréscimo de alíquotas de miltefosina em temperatura de 36° C.



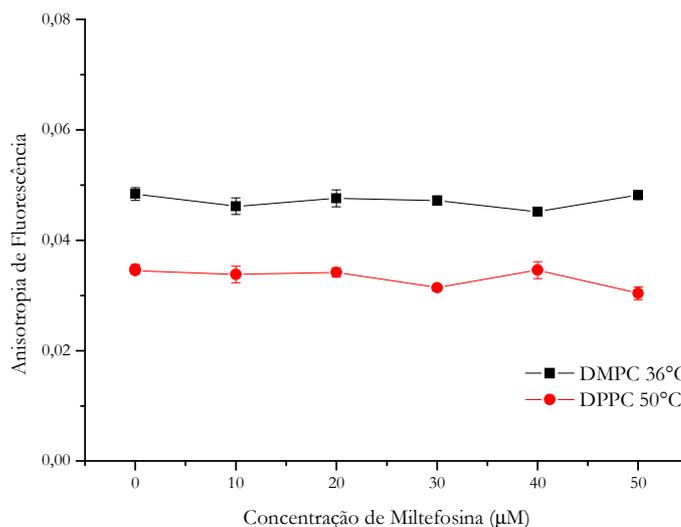
**Figura 4.18:** Espectros de fluorescência da sonda Ahba (20 μM) em solução tampão fosfato (10 mM) pH 7,4 contendo vesículas de DPPC (1 mM), com acréscimo de alíquotas de miltefosina em temperatura de 50° C.

Observamos também que a intensidade de emissão do Ahba registra ligeiro aumento, da ordem de 10%, com o acréscimo da MT (Figura 4.19).



**Figura 4.19:** Gráfico da razão das intensidades de fluorescência da sonda Ahba (20 μM) com acréscimo de alíquotas de MT em relação à ausência de MT em solução contendo vesículas de DMPC e DPPC (1 mM) em temperaturas de 36°C e 50°C, respectivamente.

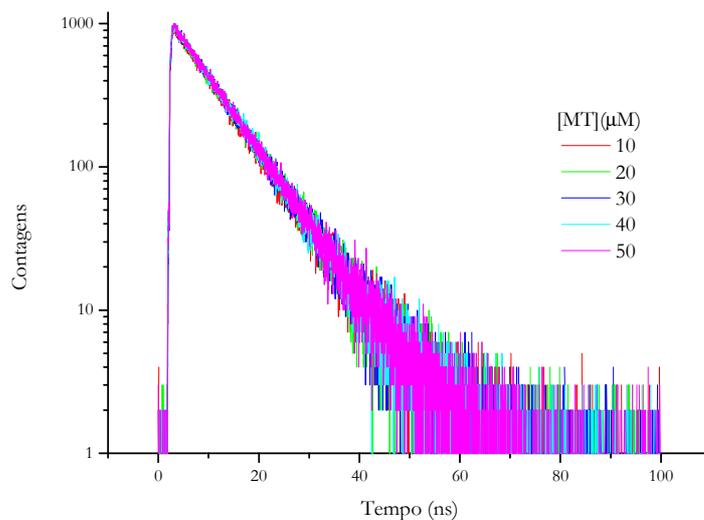
Outro parâmetro experimental que monitoramos foi a anisotropia da fluorescência do Ahba incorporado em vesículas de fosfolipídios, com o acréscimo de diferentes alíquotas de MT. Como se observa na Figura 4.20, a anisotropia da sonda é ligeiramente maior em vesículas de DMPC comparado com os valores em vesículas de DPPC. Todavia, devemos levar em conta que os experimentos com DMPC foram feitos a 36°C, enquanto as medidas com DPPC foram feitas a 50°C. Assim, é de se esperar valores de anisotropia menores no segundo caso, refletindo o menor ordenamento da bicamada em maiores temperaturas. Da mesma forma que nos espectros, os efeitos do acréscimo de MT até 50 μM não interferem na anisotropia da sonda (Figura 4.20).



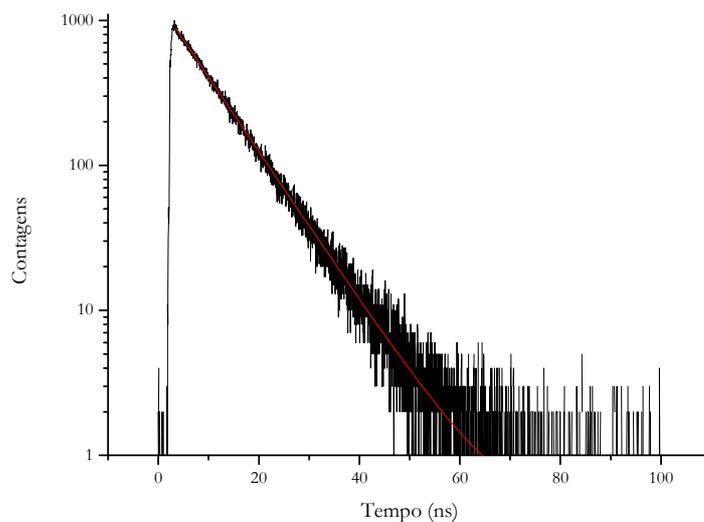
**Figura 4.20:** Gráfico da anisotropia de fluorescência da sonda Ahba (20  $\mu\text{M}$ ) em função da concentração de MT em solução contendo vesículas de DMPC e DPPC (1 mM) em temperaturas de 36°C e 50°C, respectivamente.

### Fluorescência e Anisotropia com Resolução Temporal

Foram obtidos experimentalmente perfis de decaimento da sonda Ahba em meio contendo vesículas de DPPC, com o acréscimo de diferentes concentrações de MT (Figura 4.21). Pela forma dos decaimentos, aparentemente não há efeitos apreciáveis sobre o tempo de vida do estado excitado da sonda inserida na membrana devido ao acréscimo de MT. Foram feitos ajustes dos perfis experimentais de decaimento da fluorescência a curvas de decaimento exponencial, usando métodos de ajuste por mínimos quadrados, como ilustrado na Figura 4.22. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.1 e mostram que, de fato, o acréscimo da MT não produz mudanças apreciáveis nos processos de desexcitação da sonda.



**Figura 4.21:** Decaimento da fluorescência da sonda Ahba ( $20 \mu\text{M}$ ) em solução contendo vesículas de DPPC ( $1 \text{ mM}$ ) em temperatura de  $50^\circ\text{C}$  com acréscimo de alíquotas de MT.



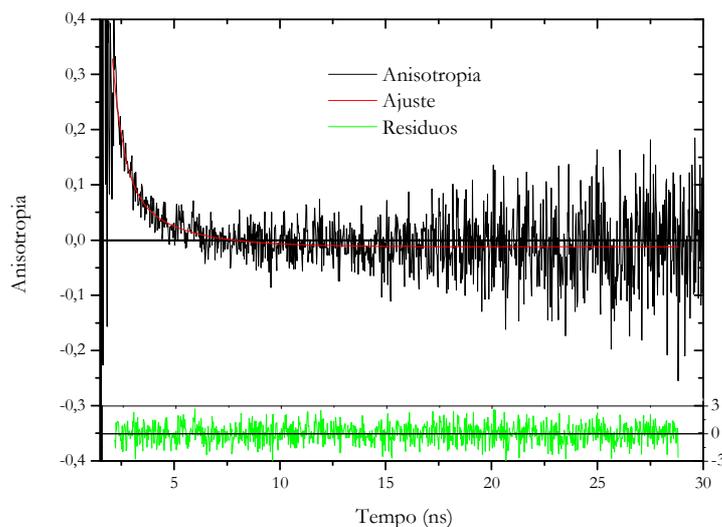
**Figura 4.22:** Ajuste exponencial do decaimento da fluorescência da sonda Ahba ( $20 \mu\text{M}$ ) solução contendo vesículas de DPPC ( $1 \text{ mM}$ ) em temperatura de  $50^\circ\text{C}$  com acréscimo de  $10 \mu\text{M}$  de MT.

**Tabela 4.1:** Tempos de vida  $\tau$  obtidos a partir do ajuste mono-exponencial do decaimento da sonda Ahba (20 $\mu$ M) em tampão fosfato (10 mM) pH 7,4, contendo vesículas de DPPC (1 mM), com o acréscimo de MT em temperatura de 50°C. Os ajustes foram obtidos no *software* fornecido pela *Edinburgh Instruments*.

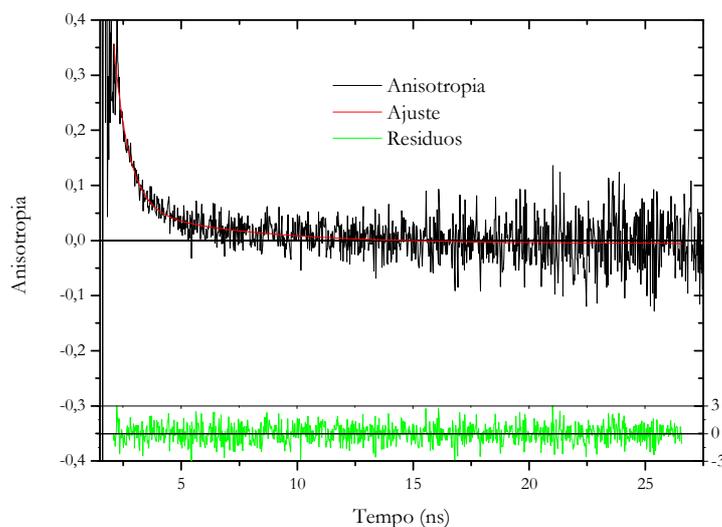
[MT] ( $\mu$ M)	$\tau$ (ns)	$\chi^2$
0	8,34 $\pm$ 0,01*	1,498
10	8,41 $\pm$ 0,02	1,192
20	8,49 $\pm$ 0,02	1,311
30	8,46 $\pm$ 0,02	1,186
40	8,49 $\pm$ 0,02	1,247
50	8,49 $\pm$ 0,02	1,249

\*melhor ajuste obtido com curva bi-exponencial, com um tempo curto de 1,47 $\pm$ 0,04 ns, responsável por 4% da fluorescência.

Obtivemos também os perfis de decaimento da anisotropia do Ahba em vesículas de DPPC, tanto sem MT como com o acréscimo da droga na concentração de 50  $\mu$ M. A Figura 4.23 e a Figura 4.24 mostram o decaimento da anisotropia, juntamente com as curvas ajustadas a um processo mono-exponencial, e o gráfico de resíduos, que ilustra a boa qualidade do ajuste. Como os outros parâmetros analisados no trabalho, o decaimento da anisotropia do Ahba mostra pouca variação com o acréscimo da MT, sendo o tempo de correlação rotacional obtido a partir dos ajustes igual a 1,27 ns nas vesículas puras, e igual a 1,14 ns nas vesículas com 50  $\mu$ M de MT. Também as anisotropias iniciais (0,226 no primeiro caso e 0,239 na presença de MT) e as anisotropias limites (-0,007 sem MT e 0,007 com MT) são relativamente semelhantes. Quando a anisotropia para tempos muito grandes não tende a zero, indica a rigidez da vesícula. Quando a temperatura é maior, a vesícula é mais fluida, e a anisotropia tende à zero, como foi observado nesses experimentos, já que foram realizados em temperaturas acima da temperatura de transição de fase dos lipídios utilizados na preparação das vesículas.



**Figura 4.23:** Decaimento da anisotropia de fluorescência da sonda Ahba (20  $\mu$ M) em solução contendo vesículas de DPPC (1 mM) em temperatura de 50°C, ajuste da curva e resíduos.



**Figura 4.24:** Decaimento da anisotropia de fluorescência da sonda Ahba (20  $\mu$ M) em solução contendo vesículas de DPPC (1 mM) em temperatura de 50°C com acréscimo de 50  $\mu$ M de MT, ajuste da curva e resíduos.

Do conjunto de dados apresentados acima, verificamos que a sonda Ahba, muito útil para estudos da cmc da MT, não monitora possíveis mudanças nas bicamadas lipídicas devido à incorporação da droga. O grupo fluorescente da sonda Ahba localiza-se na região das cabeças polares das vesículas. Assim, podemos concluir que as

modificações introduzidas pela MT na bicamada, não devem interferir significativamente naquela região da interface entre as vesículas e o meio aquoso.

### **4.3 Agregação do Análogo Fluorescente MT-BODIPY**

Com o análogo fluorescente, foram realizados experimentos de medida de parâmetros fluorescentes como posição da banda e intensidade de emissão, intensidade de emissão, tempo de vida de estado excitado e anisotropia da fluorescência, tanto em estado estacionário como resolvida no tempo. As medidas foram realizadas em diversas condições.

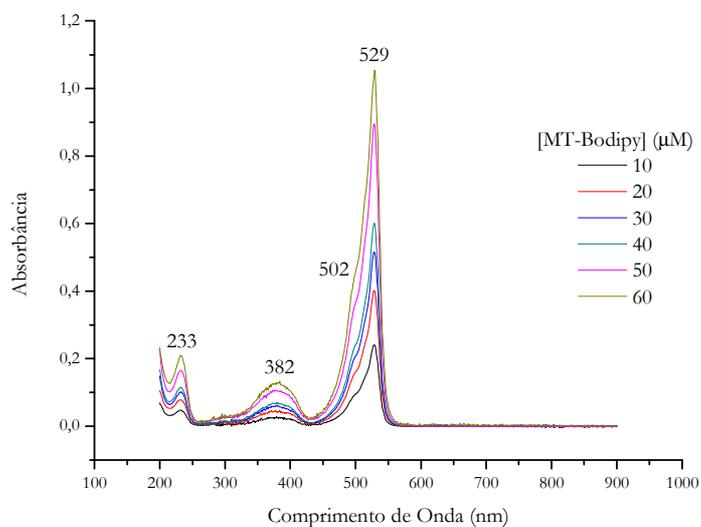
a) em tampão aquoso, para estudos sobre agregação dos compostos e determinação da cmc da MT-BODIPY. Os resultados serão comparados com aqueles obtidos usando a MT, para verificar se a inclusão do grupo fluorescente altera propriedades físico-químicas do fármaco;

b) em presença de agregados anfífilos (vesículas de fosfolípidios) para estudos sobre interação entre o derivado de MT e os agregados, pois é importante estudar a solubilidade em presença de sistemas microheterogêneos, ou seja, em um ambiente que mimetiza o meio em que a droga exerce ação biológica.

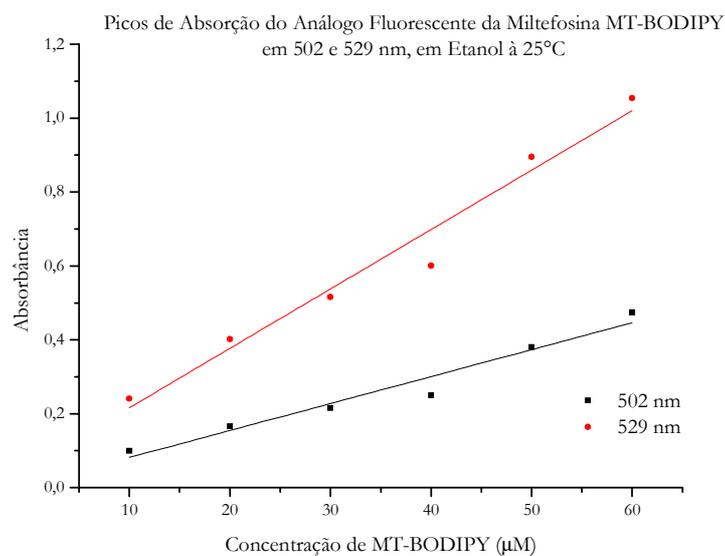
#### **4.3.1 Espectros de Absorção**

##### **Etanol**

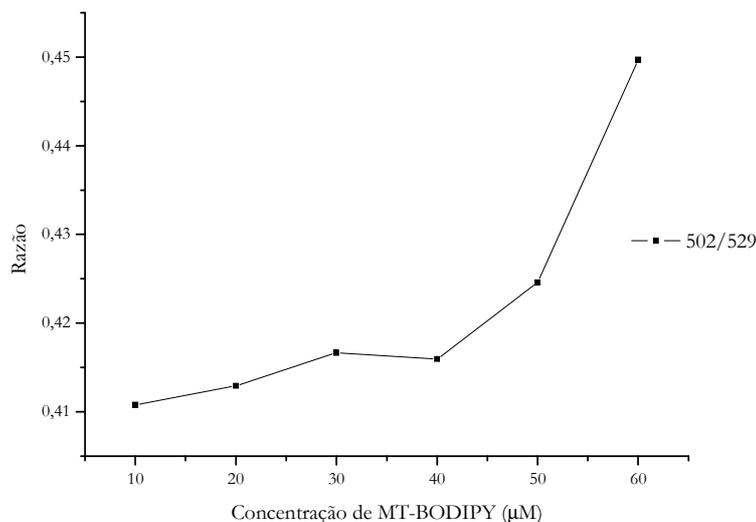
Foram feitas medidas de absorção do análogo MT-BODIPY em etanol, onde o análogo é solúvel, e em tampão, a fim de observar as propriedades de agregação do análogo em meio aquoso.



**Figura 4.25:** Espectros de absorção do análogo MT-BODIPY com aumento da concentração em etanol à 25°C.

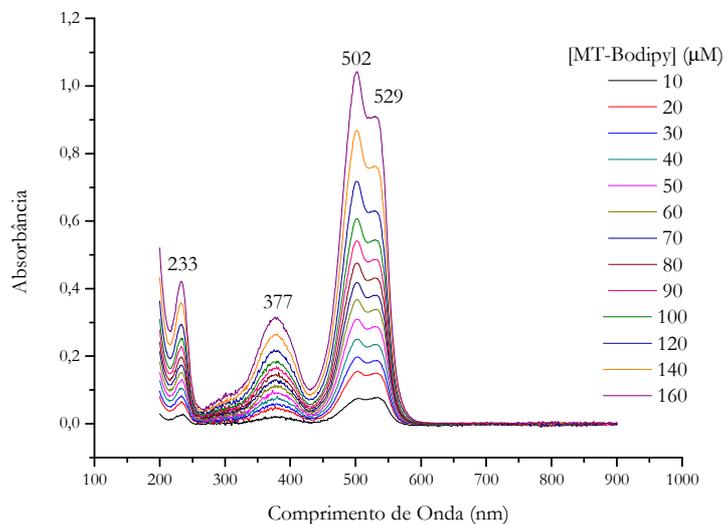


**Figura 4.26:** Máximo dos valores de absorbância do análogo MT-BODIPY em 502 e 529 nm em função da concentração em etanol à 25°C.

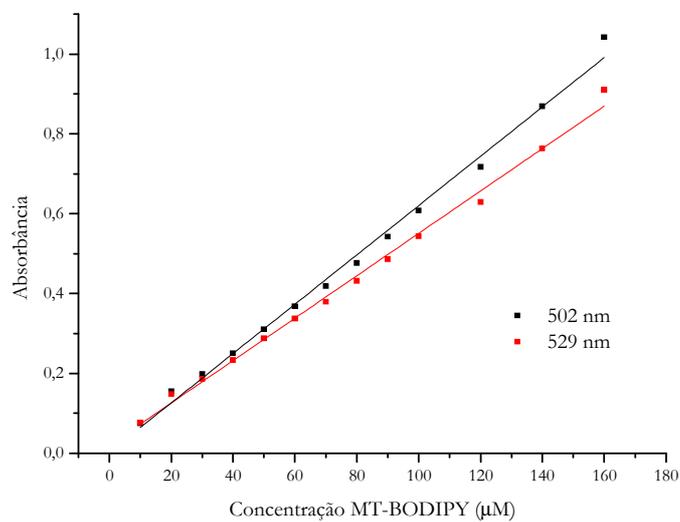


**Figura 4.27:** Razão entre os valores de absorvância do análogo MT-BODIPY em 502 e 529 nm em função da concentração em etanol à 25°C.

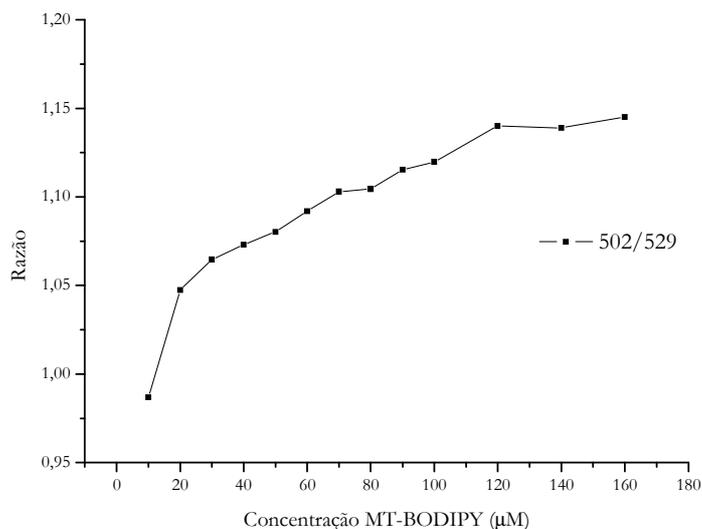
Em etanol, observa-se a banda típica de absorção do análogo MT-BODIPY, com pico em 529 nm, e um ombro em 502 nm (Figura 4.25). A absorvância dos dois picos cresce linearmente com a concentração de MT-BODIPY (Figura 4.26) e a razão entre as intensidades dos dois picos varia muito pouco, a menos da última medida, mantendo-se na faixa de 0,41 a 0,45 (Figura 4.27).

**Tampão**

**Figura 4.28:** Espectros de absorção do análogo MT-BODIPY com aumento da concentração em tampão fosfato 10 mM pH 7,4 à 25°C.

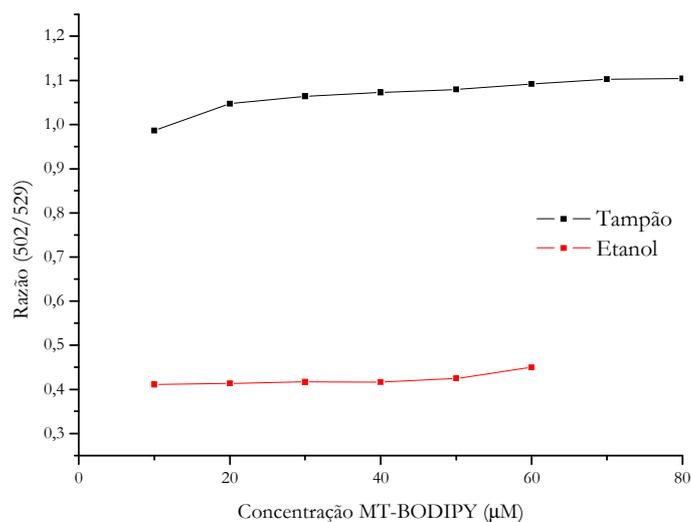


**Figura 4.29:** Máximo dos valores de absorvância do análogo MT-BODIPY em 502 e 529 nm em função da concentração em tampão fosfato 10 mM pH 7,4 à 25°C.



**Figura 4.30:** Razão entre os valores de absorvância do análogo MT-BODIPY em 502 e 529 nm em função da concentração em tampão fosfato 10 mM pH 7,4 à 25°C.

Em tampão em baixa concentração de MT-BODIPY observam-se picos em 502 e 529 nm, sendo que em 10 µM do composto os valores de absorvância são comparáveis (Figura 4.28), diferentemente do que foi verificado em etanol, onde havia apenas um ombro em 502 nm. À medida que a concentração de MT-BODIPY cresce, o pico em 502 nm tem aumento mais pronunciado que o pico em 529 nm, de maneira que a razão entre as intensidades dos dois picos fica maior que 1,0 em concentrações acima de 15 µM (Figura 4.30). Isso ocorre porque o análogo MT-BODIPY tende a formar agregados com o aumento de concentração, e isso se reflete nas bandas de absorção, com um aumento relativo maior na banda em 502 nm, comparado à banda em 529 nm (Figura 4.29).



**Figura 4.31:** Razão entre os valores de absorvância do análogo MT-BODIPY em 502 e 529 nm em função da concentração, em tampão fosfato 10 mM pH 7,4 e em etanol, à 25°C.

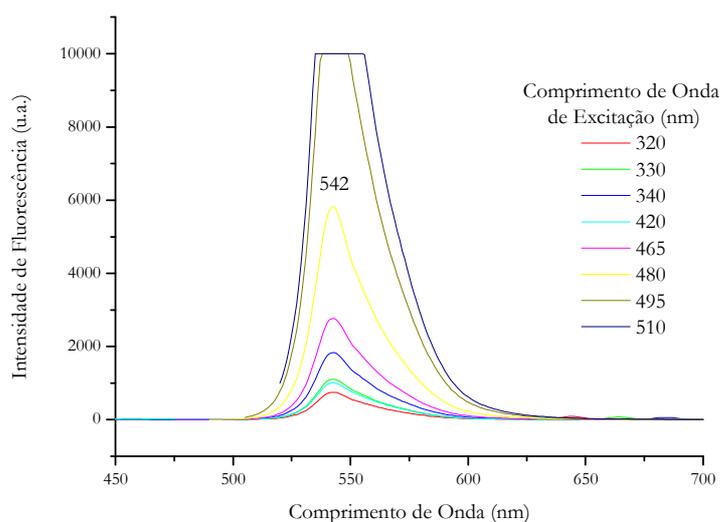
A Figura 4.31 mostra que a razão entre os picos em tampão é maior que 1,0 já em 10 µM de MT-BODIPY, e esse valor é bem maior que o de 0,4 em etanol, indicando que a partir dessa concentração já há formação de agregados em meio aquoso. A cmc obtida para a MT em tampão é de 50 µM, então o análogo fluorescente apresenta propriedades de agregação diferentes, com um valor menor de cmc, provavelmente devido ao grupo BODIPY ligado à cauda hidrofóbica da MT, aumentando sua hidrofobicidade.

Os espectros mostram duas características importantes: enquanto em etanol o composto está na forma monomérica, em meio aquoso ele apresenta-se na forma de agregados, caracterizado pelo fato que o pico em comprimento de onda menor tem intensidade maior que aquele de comprimento de onda maior [78]. Além disso, o gráfico da razão entre os picos em função da concentração indica que a cmc da MT-BODIPY está próximo de 10 µM (Figura 4.31).

### 4.3.2 Espectros de Fluorescência

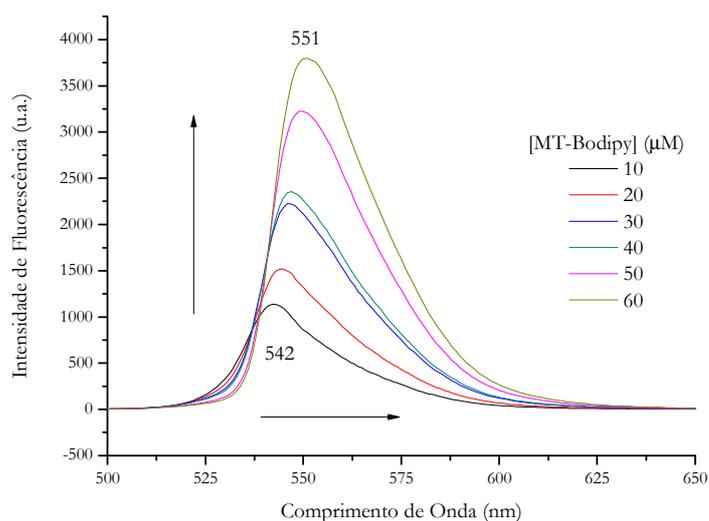
#### Etanol

O composto MT-BODIPY é solúvel em etanol e o espectro de fluorescência é representativo de sua forma monomérica. O grupo BODIPY tem deslocamento de Stokes muito pequeno, com máximo de absorção em 529 nm e máximo de emissão perto de 540 nm, e, assim, examinamos a possibilidade de analisar a fluorescência com excitação em diferentes comprimentos de onda (Figura 4.32). Isso é importante, tanto para minimizar efeitos de filtro interno devido à intensa absorção próxima da emissão, que pode alterar a forma da curva de emissão fluorescente em concentrações mais elevadas do composto, como para avaliar a possibilidade de usar comprimentos de onda fora do máximo de absorção nos experimentos com resolução temporal. Vemos (Figura 4.32) que a excitação na faixa entre 320 e 340 nm (início da banda de absorção centrada em 382 nm, ver Figura 4.25) e na região entre 420 e 510 nm (início da banda intensa que tem máximo em 529 nm) produz espectros de emissão semelhantes, com máximo em 542 nm, que diferem entre si na intensidade, a qual é proporcional à absorbância.

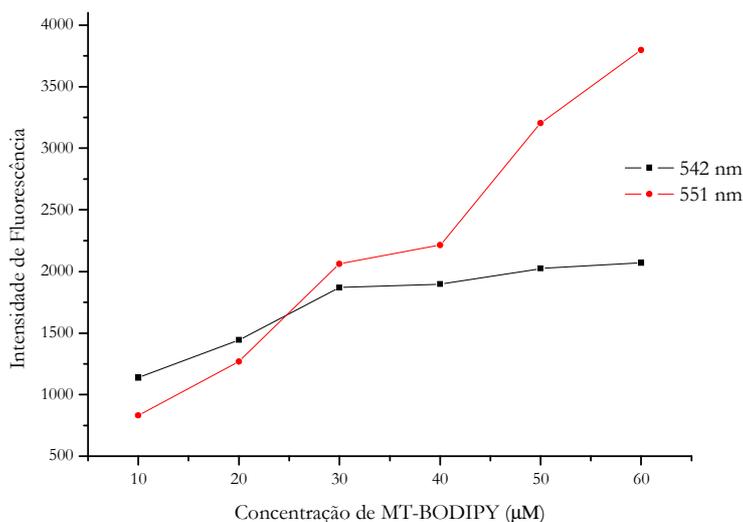


**Figura 4.32:** Espectros de fluorescência do análogo MT-BODIPY 10  $\mu$ M em etanol à 25°C para diferentes comprimentos de onda de excitação.

Com excitação em 330 nm, que é um comprimento de onda que pode ser sintonizado no espectrofluorímetro com resolução temporal, obtivemos espectros de emissão fluorescente em diversas concentrações de MT-BODIPY (Figura 4.33). Observamos mudanças na forma da curva, que pode ser devido ao fato de que o aumento da concentração do composto implica em um aumento da absorbância na banda centrada em 529 nm e que se estende até 550 nm. Esse crescimento na banda de absorção afeta mais fortemente a emissão em 542 nm que aquela em comprimentos de onda maiores, o que pode levar ao crescimento linear da intensidade da banda em 550 nm, mostrada na Figura 4.34, enquanto a intensidade da banda em 542 nm deixa de crescer em concentrações de MT-BODIPY acima de 30  $\mu\text{M}$ .



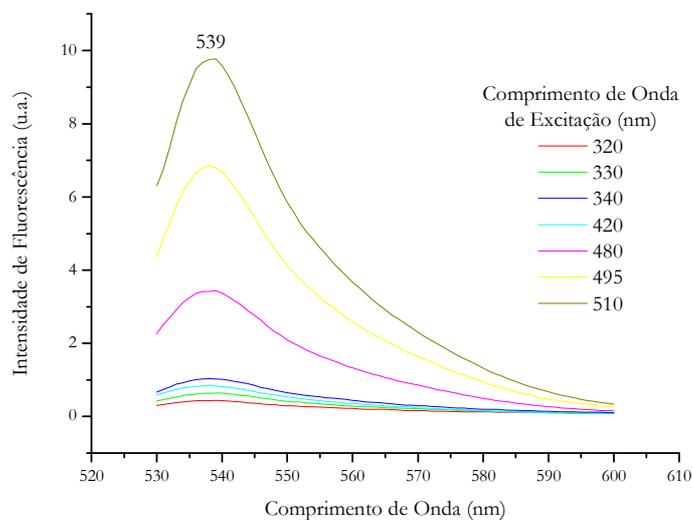
**Figura 4.33:** Espectros de fluorescência do análogo MT-BODIPY com excitação em 330 nm com aumento da concentração em etanol à 25°C.



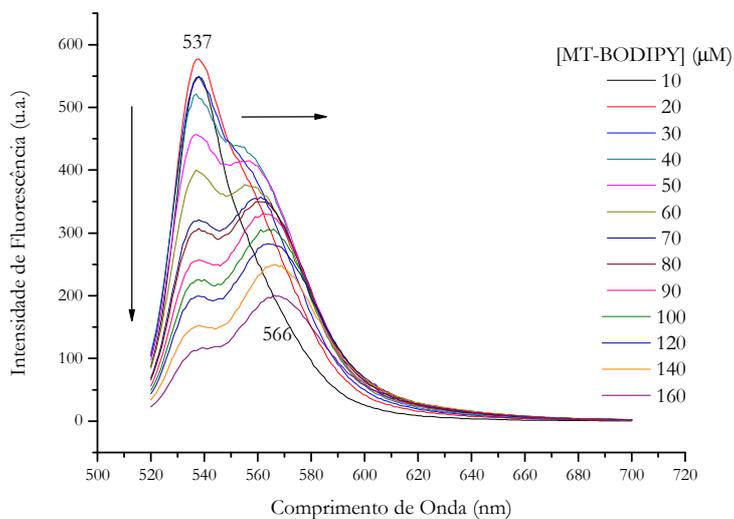
**Figura 4.34:** Máximo das intensidades de fluorescência do análogo MT-BODIPY em 542 e 551 nm em função da concentração em etanol à 25°C.

## Tampão

Como nos experimentos em etanol, analisamos a fluorescência com excitação em diferentes comprimentos de onda. Vemos (Figura 4.35) que a excitação do MT-BODIPY na concentração 10 µM em tampão pH 7,4, na faixa entre 320 e 340 nm (início da banda de absorção centrada em 380 nm, Figura 4.28) e na região entre 420 e 510 nm (início da banda intensa que tem máximo em 529 nm) produz espectros de emissão semelhantes, com máximo próximo a 540 nm e que diferem entre si na intensidade, que é proporcional à absorbância.



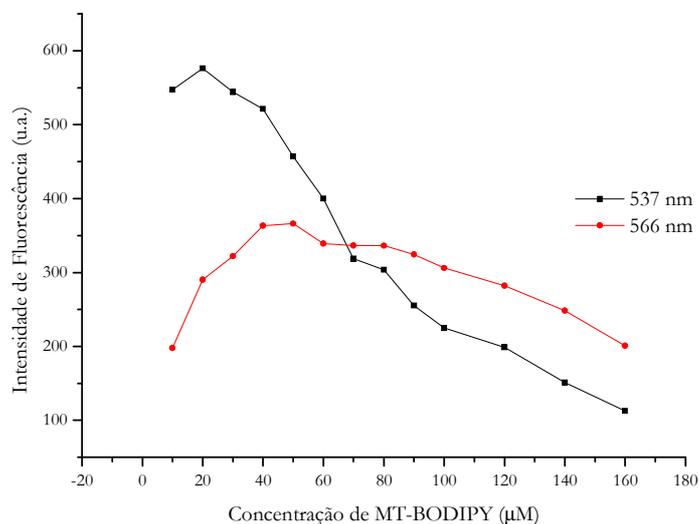
**Figura 4.35:** Espectros de fluorescência do análogo MT-BODIPY 10  $\mu\text{M}$  em tampão fosfato 10 mM pH 7,4 à 25°C para diferentes comprimentos de onda de excitação.



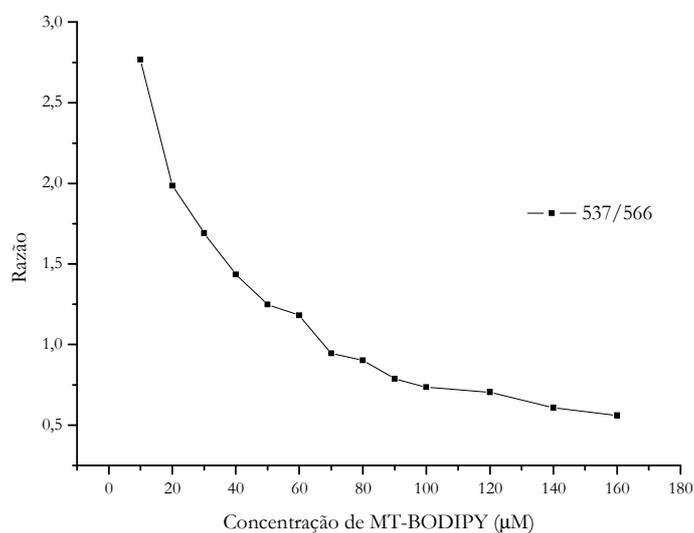
**Figura 4.36:** Espectros de fluorescência do análogo MT-BODIPY com excitação em 510 nm com aumento da concentração em tampão fosfato 10 mM pH 7,4 à 25°C.

A variação nas intensidades dos dois picos em função da concentração de MT-BODIPY (Figura 4.37 e Figura 4.38), e o surgimento da banda em 566 nm indicam que o processo de agregação do composto tem início em concentrações tão baixas como 10  $\mu\text{M}$  embora nas condições experimentais que utilizamos não se possa descartar um

componente importante que é o efeito de filtro interno, que se acentua com o aumento de concentração e se superpõe às alterações espectrais induzidas pela agregação.



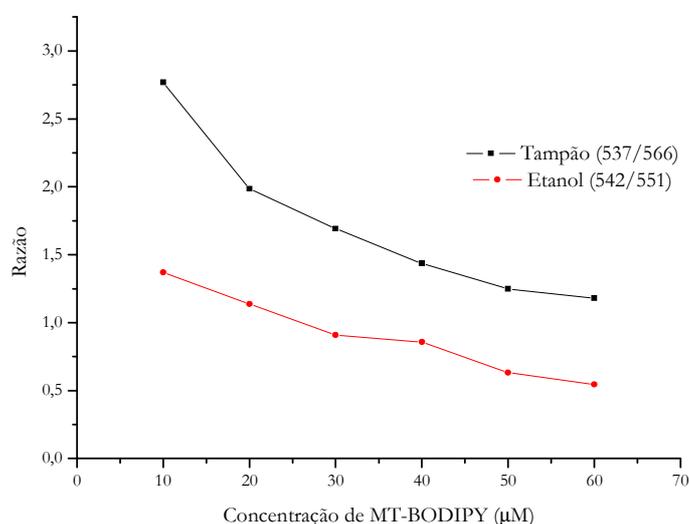
**Figura 4.37:** Máximo das intensidades de fluorescência do análogo MT-BODIPY em 537 e 566 nm em função da concentração em tampão fosfato 10 mM pH 7,4 à 25°C.



**Figura 4.38:** Razão entre os valores de intensidade de fluorescência do análogo MT-BODIPY em 537 e 566 nm em função da concentração em tampão fosfato 10 mM pH 7,4 à 25°C.

Em meio aquoso, o análogo fluorescente MT-BODIPY tende a formar agregados com o aumento de concentração, e isso se reflete nas bandas de absorção, com um

aumento relativo maior na banda em 502 nm, comparado à banda em 530 nm (Figura 4.28). A emissão fluorescente do composto em meio aquoso difere daquela em etanol, com o surgimento de uma banda centrada em 566 nm com o crescimento da concentração, além da banda centrada em 537 nm (Figura 4.39). A razão entre as intensidades das bandas de comprimento curto (542 nm em etanol e 537 nm em tampão) e as intensidades das bandas de comprimento longo (551 nm em etanol e 566 nm em tampão) também depende do meio, sendo mais elevada em tampão que em etanol para concentrações de até 60  $\mu\text{M}$  de MT-BODIPY.

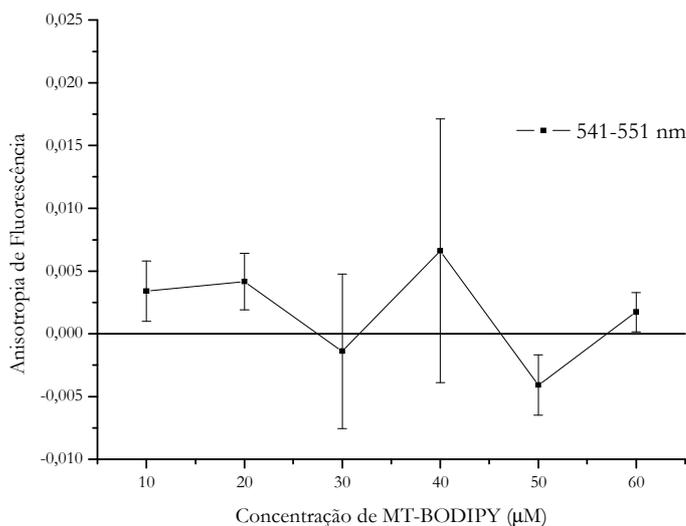


**Figura 4.39:** Razão entre os valores de intensidade de fluorescência do análogo MT-BODIPY em 537 e 566 nm em função da concentração em tampão fosfato 10 mM pH 7,4 à 25°C.

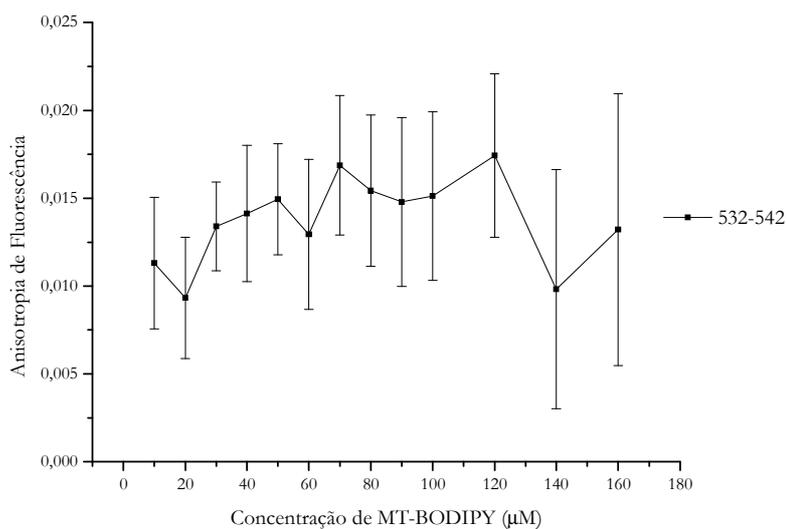
### 4.3.3 Anisotropia de Fluorescência em Estado Estacionário

A dependência entre a anisotropia da fluorescência em estado estacionário e a concentração de MT-BODIPY foi examinada tanto em etanol como em solução tampão. Os resultados mostram que em etanol (Figura 4.40) a anisotropia do composto é bem próxima de zero, indicando que os processos de despolarização são típicos de um fluoróforo com grande mobilidade. Por outro lado, em tampão (Figura 4.41) os valores

de anisotropia são significativamente maiores (entre 0,010 e 0,015), mesmo nas menores concentrações de MT-BODIPY. Os resultados concordam com os obtidos a partir dos espectros de absorção e de emissão, mostrando que em etanol o composto está na forma monomérica e que forma agregados em meio aquoso.



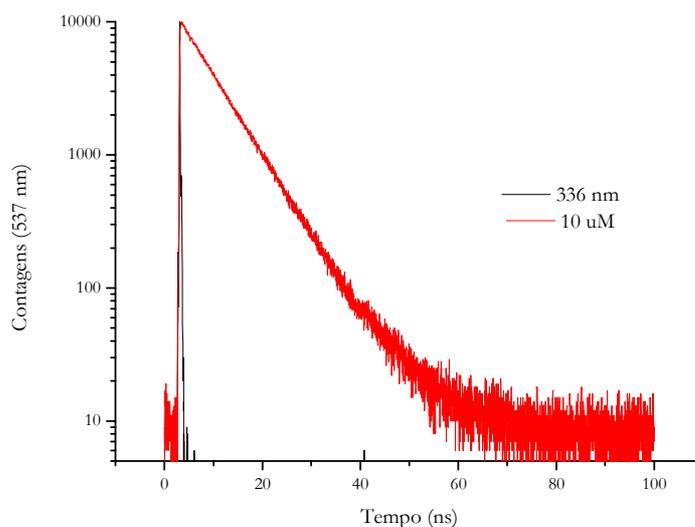
**Figura 4.40:** Gráfico da anisotropia de fluorescência do análogo MT-BODIPY em função da concentração em etanol à 25°C.



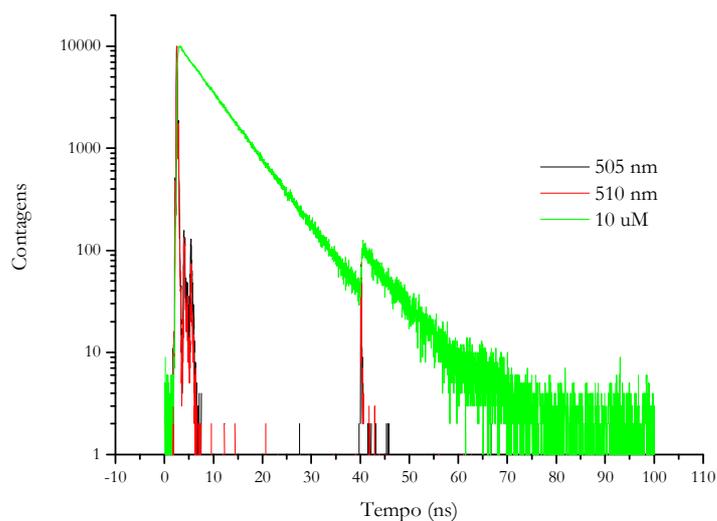
**Figura 4.41:** Gráfico da anisotropia de fluorescência do análogo MT-BODIPY em função da concentração em tampão fosfato 10 mM pH 7,4 à 25°C.

### 4.3.4 Decaimento da Fluorescência e da Anisotropia

Experimentos com resolução temporal permitiram a obtenção dos perfis de decaimento da intensidade de fluorescência da MT marcada. As medidas com o composto na concentração de 10  $\mu\text{M}$  estão ilustradas na Figura 4.42 e na Figura 4.43 em etanol e em tampão fosfato, pH 7,4, respectivamente.



**Figura 4.42:** Decaimento da intensidade de fluorescência do análogo MT-BODIPY em concentração de 10  $\mu\text{M}$  em etanol à 25°C com emissão em 537 nm.



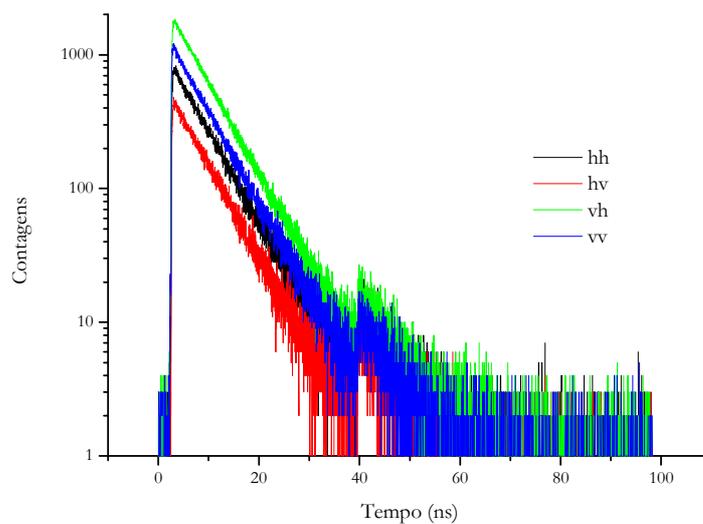
**Figura 4.43:** Decaimento da intensidade de fluorescência do análogo MT-BODIPY em concentração de 10  $\mu\text{M}$  em tampão fosfato 10 mM pH 7,4 à 25°C, e resposta do instrumento em 505 e 510 nm.

Os decaimentos foram ajustados por curvas multi-exponenciais, sendo que o melhor ajuste correspondeu a processos bi-exponenciais (Tabela 4.2). Todavia, é importante notar que a contribuição de tempos curtos foi muito pequena, correspondendo a 0,3% da emissão total para a amostra em etanol e a 2,2% em meio aquoso, de modo que o decaimento é praticamente mono-exponencial. Os tempos de vida da componente principal são um pouco maiores em etanol (7,18 ns, contra 6,64 ns em tampão), meio no qual o rendimento quântico da fluorescência é mais elevado.

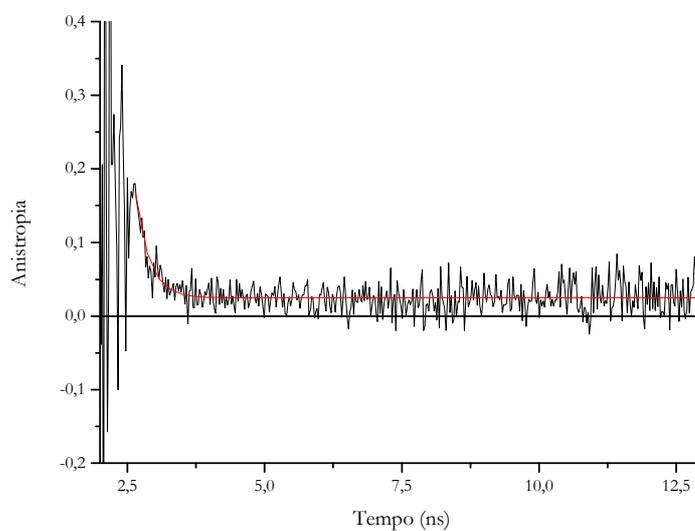
**Tabela 4.2:** Resultados do ajuste de decaimento da intensidade de fluorescência: tempos de vida ( $\tau_i$ ), fatores pré-exponenciais ( $I_i$ ) e contribuição percentual da componente de tempo longo ( $\%_{(1)}$ ) para o decaimento de MT-BODIPY em etanol e em tampão fosfato (10nM) pH 7,4 em temperatura de 25°C, excitação em 330 nm e 505 nm, respectivamente, e emissão em 537 nm. Os ajustes foram obtidos no *software* fornecido pela *Edinburgh Instruments*.

Meio	$\tau_1$ (ns)	$\tau_2$ (ns)	$I_1$	$I_2$	$\%_{(1)}$
<b>Etanol</b>	7,18 ± 0,01	0,43 ± 0,08	0,148 ± 0,002	0,007 ± 0,001	99,7
<b>Tampão</b>	6,64 ± 0,01	1,73 ± 0,13	0,127 ± 0,001	0,011 ± 0,001	97,8

Nos experimentos com excitação e emissão polarizadas, foram obtidos os decaimentos em diferentes combinações de orientação dos polarizadores (Figura 4.44). Utilizando esses decaimentos, foi calculada a anisotropia com resolução temporal, obtendo-se o perfil de decaimento da anisotropia, como ilustrado na Figura 4.45, que mostra também o gráfico do ajuste da curva monoexponencial. Os dados resultantes do ajuste do decaimento da anisotropia para a MT marcada em solução tampão estão apresentados na Tabela 4.3.



**Figura 4.44:** Decaimento da intensidade de fluorescência do análogo MT-BODIPY em concentração de 10  $\mu\text{M}$  em tampão fosfato 10 mM pH 7,4 à 25°C, para as diferentes combinações dos polarizadores de excitação e emissão.



**Figura 4.45:** Decaimento da anisotropia de fluorescência do análogo MT-BODIPY em concentração de 10  $\mu\text{M}$  em tampão fosfato 10 mM pH 7,4 à 25°C.

**Tabela 4.3:** Resultados do ajuste de decaimento da anisotropia de fluorescência: tempos de correlação rotacional ( $\theta$ ), anisotropia de tempo zero ( $A_0$ ) e anisotropia em tempo infinito ( $A_\infty$ ) do análogo MT-BODIPY em tampão fosfato pH 7,4 em temperatura de 25°C, excitação em 330 nm e 505 nm, respectivamente, e emissão 537 nm. Os ajustes foram obtidos no *software* fornecido pela *Edinburgh Instruments*. Os valores de chi-quadrado reduzido variaram entre 0,968 e 1,067.

[MT-BODIPY] ( $\mu\text{M}$ )	$\theta$ (ns)	$A_0$	$A_\infty$
10	$0,30 \pm 0,02$	$0,204 \pm 0,016$	0,024
20	$0,33 \pm 0,02$	$0,092 \pm 0,024$	0,013
30	$0,36 \pm 0,02$	$0,156 \pm 0,023$	0,021
40	$0,38 \pm 0,02$	$0,205 \pm 0,034$	-0,006
60	$0,31 \pm 0,02$	$0,240 \pm 0,063$	0,009
80	$0,33 \pm 0,02$	$0,246 \pm 0,061$	0,007
100	$0,45 \pm 0,02$	$0,147 \pm 0,020$	0,035

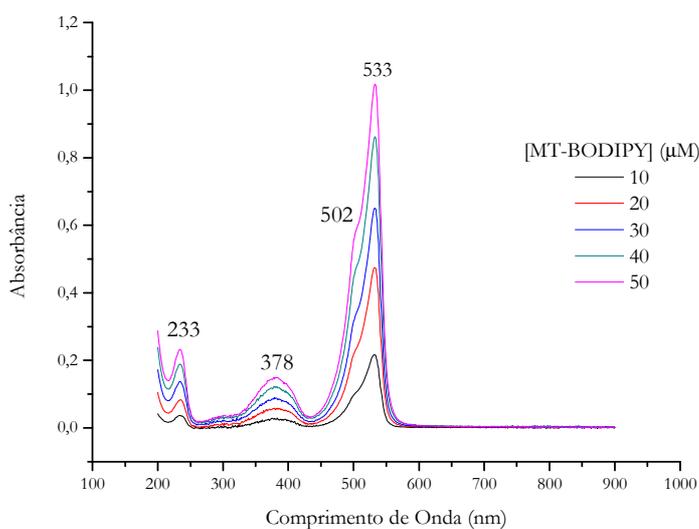
Os tempos de correlação rotacional  $\theta$  na faixa de 300 ps indicam um movimento rotacional rápido da molécula em meio aquoso. Por outro lado, valores de anisotropia no infinito ( $A_\infty$ ) diferentes de zero indicam que existem restrições à rotação da molécula, possivelmente pela sua presença em agregados.

#### 4.3.5 Interação do Análogo MT-BODIPY com Vesículas

A concentração de MT-BODIPY nas vesículas é diferente daquela em solução, já que, devido ao seu caráter anfifílico, ela deve ir para as vesículas de fosfolipídios. Como a concentração adicionada de MT em solução varia de 0 à 50  $\mu\text{M}$ , e a concentração de fosfolipídios na solução com vesículas é de 1 mM, há uma razão de 0 à 5 moléculas de MT BODIPY para 100 moléculas de fosfolipídios nas vesículas. Essa concentração é alta, e, provavelmente, a agregação entre as moléculas de MT ocorre com a adição de menos monômeros do que em solução aquosa, já que as moléculas de MT devem se agregar na própria bicamada.

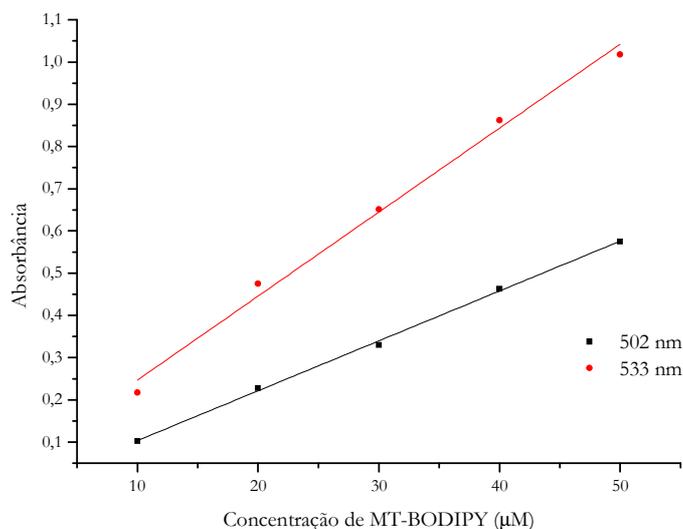
### Espectros de Absorção e de Excitação

Obtivemos espectros de absorção do MT-BODIPY na presença de vesículas de DMPC (Figura 4.46). Foram acrescentadas alíquotas de MT-BODIPY à suspensão de vesículas, de modo que os espectros correspondem a diferentes concentrações da molécula.

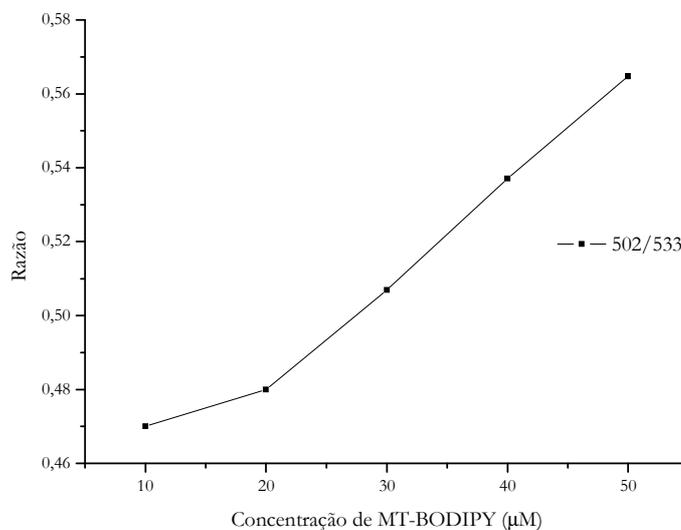


**Figura 4.46:** Espectros de absorção do análogo fluorescente MT-BODIPY com aumento da concentração em solução com vesículas de DMPC 1 mM à 36°C.

A partir dos espectros observamos um pico em 533 nm com um ombro em 502, à semelhança do obtido em etanol, indicando que a molécula está na forma monomérica na bicamada. Há um pequeno deslocamento do pico em relação àquele de 529 nm em etanol, o que ocorre, provavelmente, devido à interação da molécula com a vesícula. As intensidades crescem linearmente com a concentração (Figura 4.47). A razão entre as intensidades aumenta com a concentração (Figura 4.48), sugerindo um efeito de agregação do MT-BODIPY na bicamada.



**Figura 4.47:** Máximo da absorvância do análogo fluorescente MT-BODIPY em 502 e 533 nm com aumento da concentração em solução com vesículas de DMPC 1 mM à 36°C.



**Figura 4.48:** Razão entre as absorvâncias do análogo fluorescente MT-BODIPY em 502 e 533 nm em função da concentração em solução com vesículas de DMPC 1 mM à 36°C.

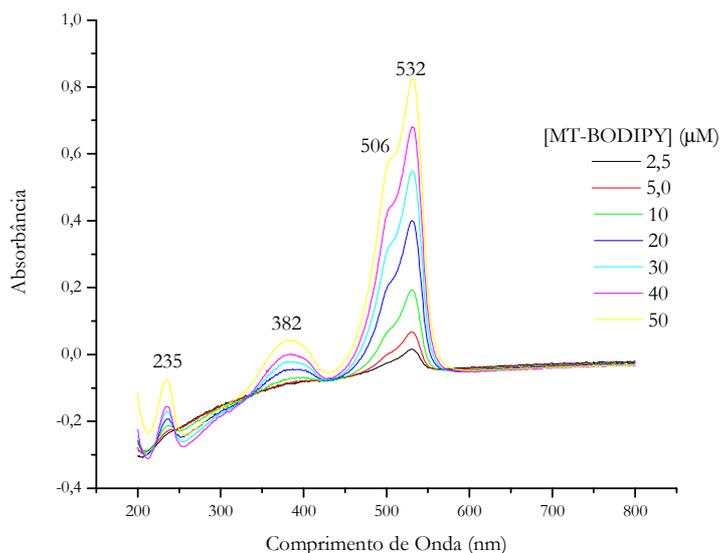
Foram calculados os valores dos coeficientes de absorção molar em cada um dos meios estudados, e os resultados, para os comprimentos de onda do pico e do ombro estão apresentados na Tabela 4.4. Pode-se observar que no pico de máximo, próximo à 530 nm, os coeficientes em etanol e em vesículas de DMPC são próximos e bem maiores que o valor obtido para a solução tampão. Essa propriedade deve estar

relacionada à agregação do MT-BODIPY em tampão. Observa-se também que o coeficiente de absorção em tampão é maior no comprimento de onda do ombro, em 502 nm, o que corrobora a hipótese de agregação em meio aquoso.

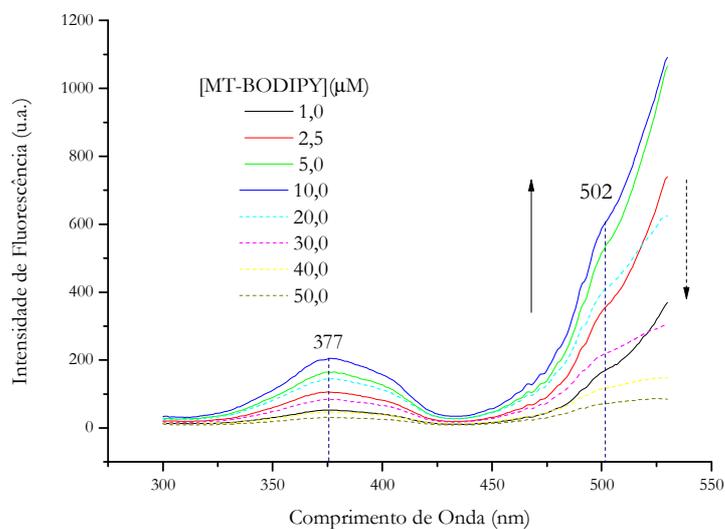
**Tabela 4.4:** Coeficiente de absorção molar  $\epsilon$  calculado em cada um dos meios estudados (tampão, etanol e suspensão de vesículas de DMPC) no ombro (502 nm) e no pico de absorção (529, 529 e 533 nm, respectivamente).

Meio	Etanol		Tampão		DMPC	
$\lambda$ (nm)	502	529	502	529	502	533
$\epsilon$ ( $M^{-1} cm^{-1}$ )	7290	16080	6180	5310	11810	19890

De maneira análoga, foram feitos espectros de absorção na presença de vesículas de DPPC (Figura 4.49), os quais apresentam um pico e um ombro semelhantes aos obtidos na presença de vesículas de DMPC. Em comprimentos de onda menores, observam-se valores de absorbância negativos devido aos efeitos de espalhamento diferentes na cubeta de referência em relação à cubeta com a solução de interesse. Os valores negativos sugerem que a solução de referência está espalhando mais a luz do que a solução de interesse. Os espectros de excitação (Figura 4.50) não apresentam esse artefato experimental.

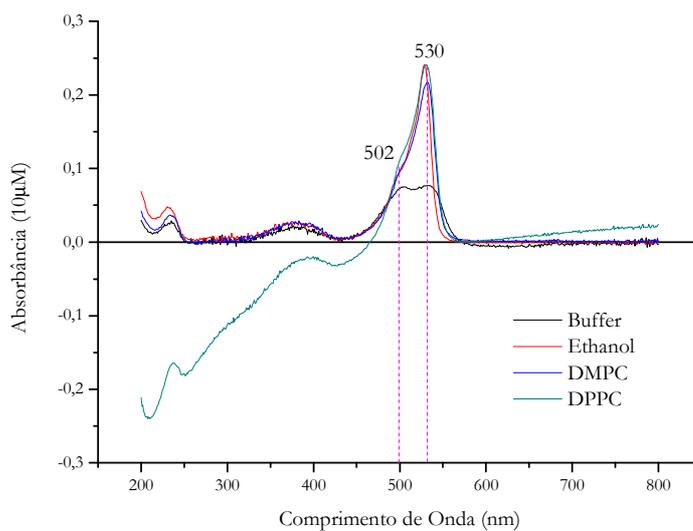


**Figura 4.49:** Espectros de absorção do análogo fluorescente MT-BODIPY com aumento da concentração em solução com vesículas de DPPC 1 mM à 50°C.



**Figura 4.50:** Espectros de excitação do análogo MT-BODIPY com emissão em 540 nm em solução com vesículas de DPPC 1 mM à 50°C.

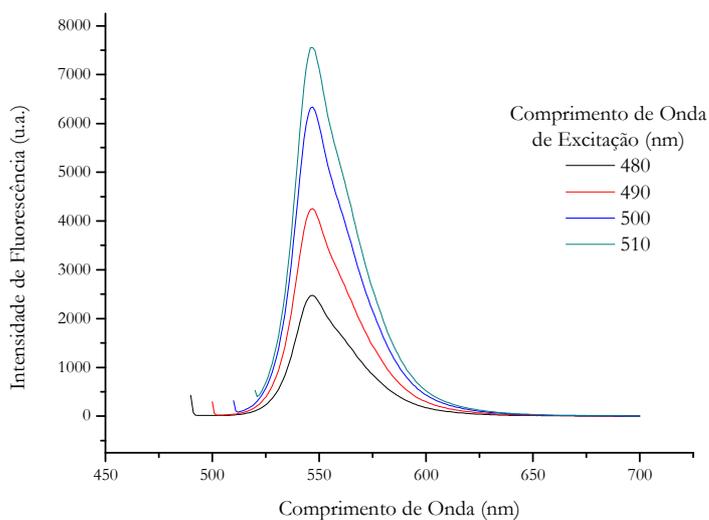
A diminuição observada na intensidade de fluorescência para concentrações maiores que 10  $\mu\text{M}$  indica que há efeito de filtro interno, já que a emissão estava sendo observada em 540 nm.



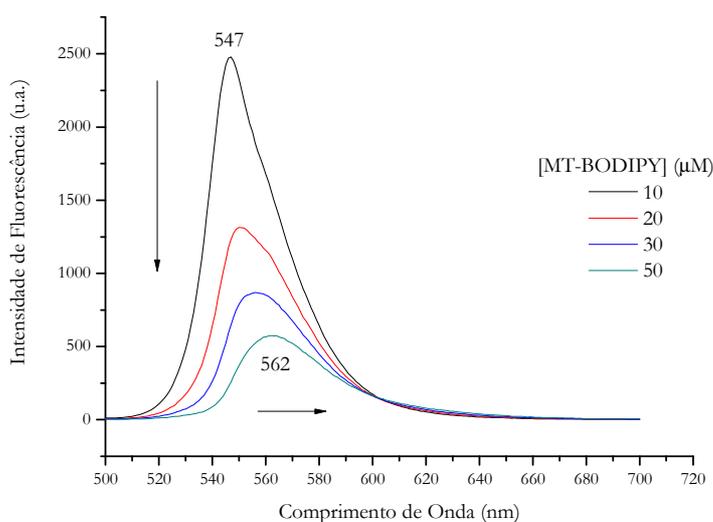
**Figura 4.51:** Comparação entre os espectros de absorção do análogo MT-BODIPY 10  $\mu\text{M}$  nos diferentes meios.

### Espectros de Fluorescência

Obtivemos espectros de emissão do MT-BODIPY em vários comprimentos de onda de excitação (Figura 4.52), e eles mostram que há mudança somente na intensidade da emissão em função da excitação, isso porque há variação na absorção dependendo do comprimento de onda de excitação. Com excitação em 480 nm, obtivemos espectros em diferentes concentrações (Figura 4.53).

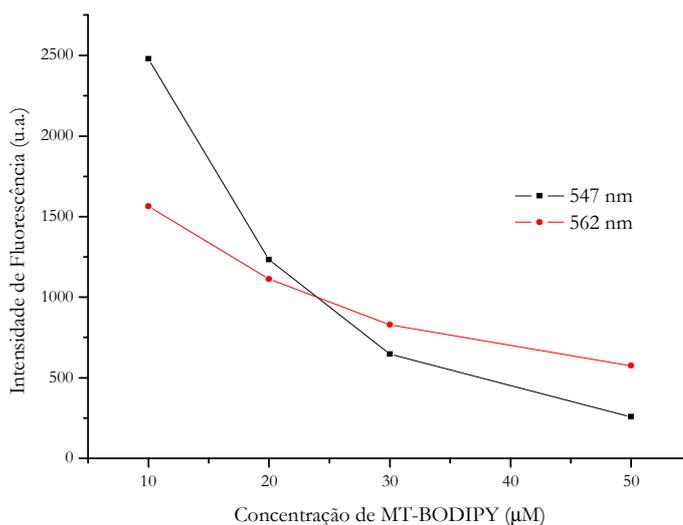


**Figura 4.52:** Espectros de fluorescência do análogo MT-BODIPY 10  $\mu\text{M}$  para diferentes comprimentos de onda de excitação em solução com vesículas de DMPC 1 mM à 36°C.



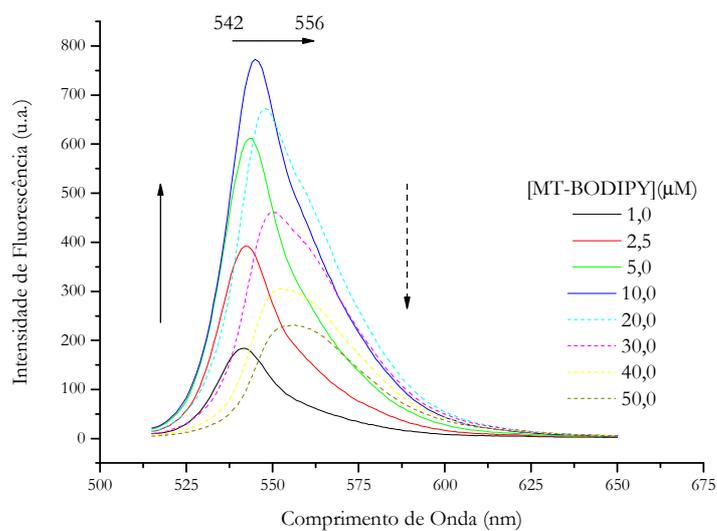
**Figura 4.53:** Espectros de fluorescência do análogo MT-BODIPY com excitação em 480 nm em solução com vesículas de DMPC 1 mM à 36°C.

Observa-se que há um deslocamento no comprimento de onda de máxima emissão do MT-BODIPY em solução com vesículas de DMPC de 547 para 562 nm (Figura 4.54), o que pode ocorrer devido à agregação dos monômeros de MT-BODIPY nas bicamadas. A diminuição da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração pode ser explicado pelo efeito de filtro interno.

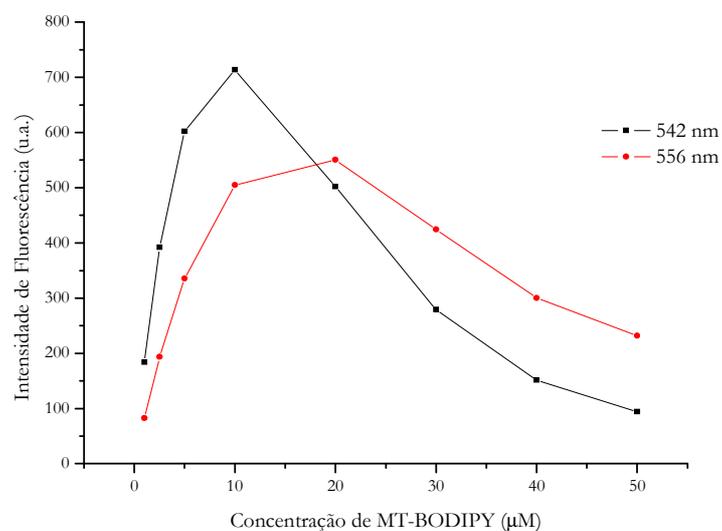


**Figura 4.54:** Máximos de intensidade de fluorescência do análogo MT-BODIPY, em 547 e 562 nm, com excitação em 480 nm em solução com vesículas de DMPC 1 mM à 36°C.

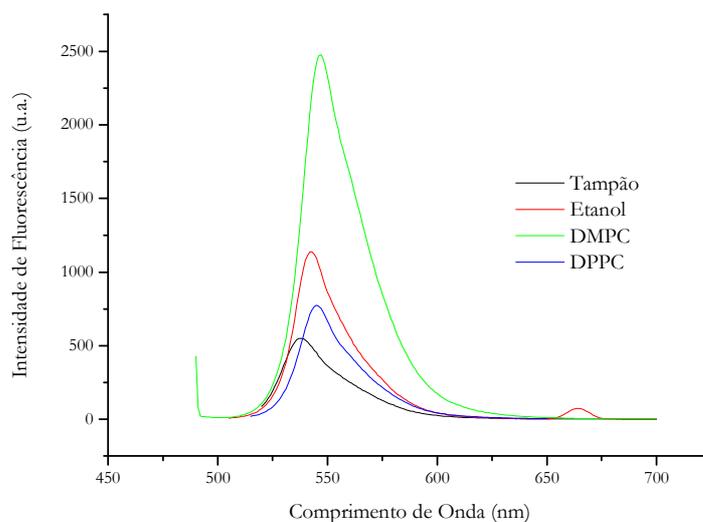
Foram feitos espectros de fluorescência do MT-BODIPY em solução contendo vesículas de DPPC, com aumento da concentração do análogo (Figura 4.55). Pode-se observar que há um aumento da intensidade de fluorescência até 10 µM de MT-BODIPY, a partir de quando a intensidade começa a diminuir (Figura 4.56). Esse efeito de diminuição da intensidade de fluorescência é o mesmo observado em vesículas de DMPC, o qual também ocorre acima de 10 µM.



**Figura 4.55:** Espectros de fluorescência do análogo MT-BODIPY com excitação em 505 nm em solução com vesículas de DPPC 1 mM à 50°C.



**Figura 4.56:** Máximos de intensidade de fluorescência do análogo MT-BODIPY, em 542 e 556 nm, com excitação em 505 nm em solução com vesículas de DPPC 1 mM à 50°C.



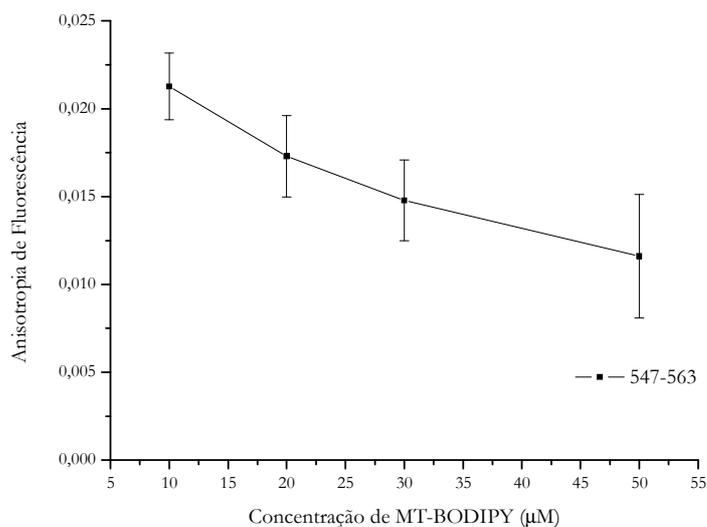
**Figura 4.57:** Comparação entre os espectros de fluorescência do análogo MT-BODIPY 10  $\mu$ M nos diferentes meios.

Observamos deslocamento do máximo, tanto em DMPC quanto em DPPC, que pode ser originado por efeitos de filtro combinados com interações entre moléculas de MT-BODIPY devido à maior proximidade entre elas nas concentrações mais elevadas.

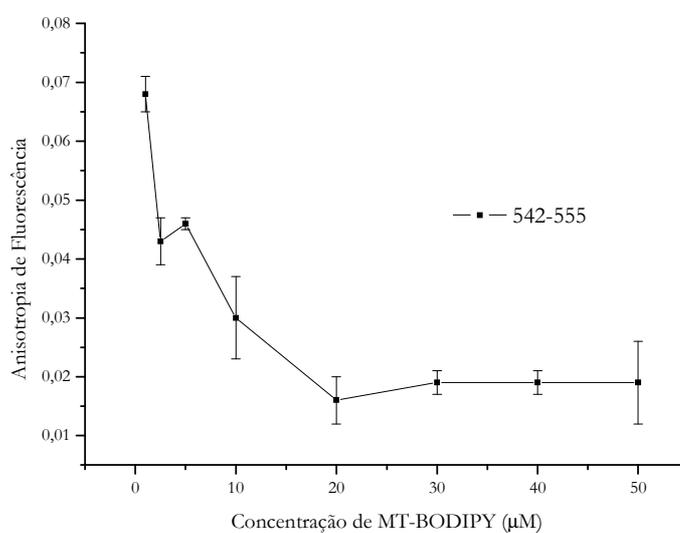
O formato dos espectros de fluorescência é semelhante em etanol, na presença de vesículas de DMPC e DPPC, o que indica que o MT-BODIPY está em forma monomérica, enquanto em tampão há agregação (Figura 4.57).

### Anisotropia

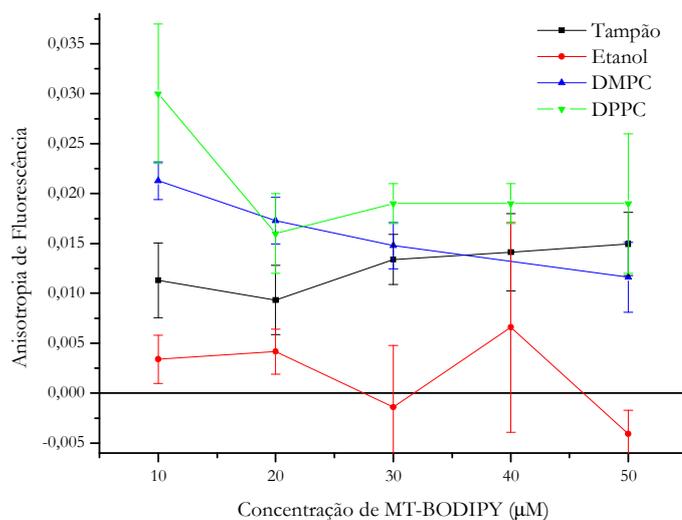
O aumento da concentração de MT-BODIPY promove uma diminuição na anisotropia de estado estacionário, tanto em DMPC como em DPPC (Figura 4.58 e Figura 4.59). Esse efeito não foi observado em etanol nem em tampão (Figura 4.60), indicando que o aumento da concentração de MT-BODIPY nas bicamadas promove uma diminuição na organização das mesmas. É importante lembrar que, a sonda Ahba, que se localiza na região das cabeças polares, não mostrou esses efeitos. O acúmulo de MT-BODIPY nas bicamadas das vesículas provoca mudanças na região apolar, que é onde está localizado o grupo fluorescente BODIPY.



**Figura 4.58:** Anisotropia de fluorescência do análogo MT-BODIPY com o aumento da concentração em solução com vesículas de DMPC 1 mM à 36°C no intervalo de comprimentos de onda de 547 à 563 nm.



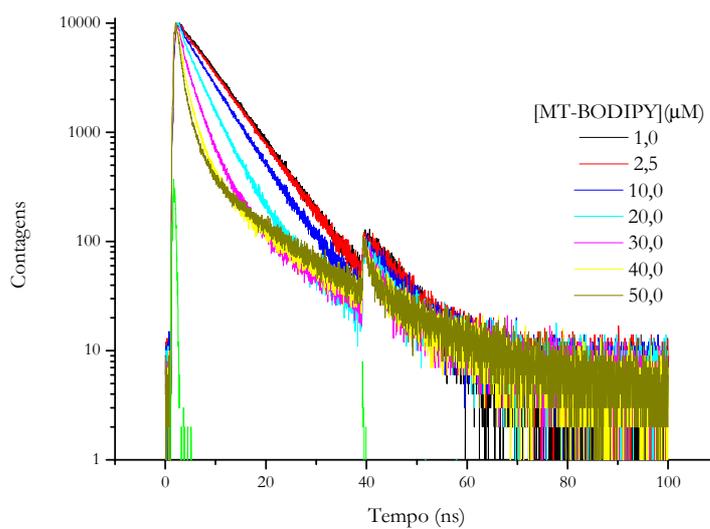
**Figura 4.59:** Anisotropia de fluorescência do análogo MT-BODIPY com o aumento da concentração em solução com vesículas de DPPC 1 mM à 50°C no intervalo de comprimentos de onda de 542 à 555 nm.



**Figura 4.60:** Comparação da anisotropia de fluorescência do análogo MT-BODIPY com o aumento da concentração nos diferentes meios.

### Decaimento da Intensidade e da Anisotropia de Fluorescência

Foram realizados experimentos de fluorescência com resolução temporal com o análogo fluorescente da MT, a fim de observar as alterações no domínio do tempo.



**Figura 4.61:** Decaimento da intensidade de fluorescência do análogo MT-BODIPY com o aumento da concentração em solução com vesículas de DPPC 1 mM à 50°C.

O decaimento da intensidade muda drasticamente com o aumento da concentração de MT-BODIPY (Figura 4.61). O processo mono-exponencial ocorre até a concentração de 10  $\mu\text{M}$ , e, a partir daí, os ajustes passam a ser tri-exponenciais. Na Tabela 4.5 vemos que o tempo de vida inicialmente era da ordem de 7 ns, comparável aos valores obtidos em etanol e tampão. Os tempos de vida diminuem gradualmente, com o surgimento de componentes mais longos (acima de 10 ns, com fator pré-exponencial normalizado pequeno) e muito curtos (da ordem de 1 ns). O decaimento complexo pode corresponder à presença de diferentes vizinhanças das moléculas.

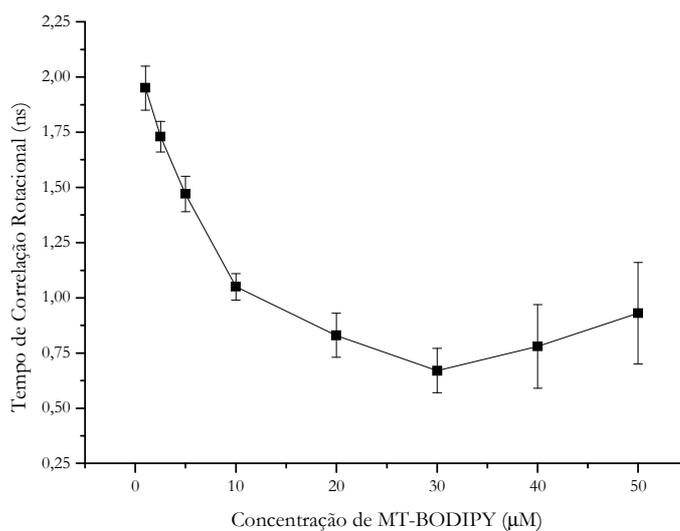
**Tabela 4.5:** Parâmetros do ajuste do decaimento da fluorescência do MT-BODIPY para as diferentes concentrações em solução contendo vesículas de DPPC (1 mM) em temperatura de 50°C.

[MT-BODIPY] ( $\mu\text{M}$ )	$\tau_1$ (ns)	$\tau_2$ (ns)	$\tau_3$ (ns)	% <sub>1</sub>	% <sub>2</sub>	% <sub>3</sub>	$\chi^2$
1,0	---	6,99±0,01	---	---	100	---	1,485
2,5	---	6,88±0,01	---	---	100	---	1,377
10	0,82±0,06	5,96±0,82	---	8,46	91,54	---	1,283
20	0,84±0,05	4,02±0,07	9,76±1,22	15,97	78,41	5,62	1,237
30	1,64±0,05	3,57±0,16	18,73±4,46	53,93	43,70	2,37	1,629
40	1,20±0,02	2,88±0,16	12,08±0,77	70,87	24,84	4,29	1,626
50	0,94±0,01	2,64±0,13	12,49±0,52	76,61	18,44	4,96	1,345

Medimos os decaimentos da anisotropia de fluorescência para as diferentes concentrações de MT-BODIPY em solução na presença de vesículas de DPPC, os quais foram ajustados por mono-exponenciais, cujos parâmetros estão na Tabela 4.6. Verificamos que o tempo de correlação rotacional  $\theta$  diminui, mostrando que o MT-BODIPY desorganiza a bicamada lipídica (Figura 4.62). Novamente, o efeito observado na região das cadeias alifáticas usando MT-BODIPY não foi observado na região das cabeças polares utilizando a sonda Ahba.

**Tabela 4.6:** Parâmetros do ajuste do decaimento da anisotropia de fluorescência do MT-BODIPY para as diferentes concentrações em solução contendo vesículas de DPPC (1 mM) em temperatura de 50°C.

[MT-BODIPY] ( $\mu\text{M}$ )	Fator $G$	Fator Pré-Exponencial $A_1$	Tempo de Correlação $\theta_1$	Chi-Squared $\chi^2$
1,0	1,777	0,213 $\pm$ 0,007	1,95 $\pm$ 0,10	0,932
2,5	1,779	0,249 $\pm$ 0,070	1,73 $\pm$ 0,07	0,941
5,0	1,759	0,229 $\pm$ 0,080	1,47 $\pm$ 0,08	0,985
10	1,621	0,197 $\pm$ 0,010	1,05 $\pm$ 0,06	1,011
20	1,774	0,140 $\pm$ 0,010	0,83 $\pm$ 0,10	0,970
30	1,625	0,161 $\pm$ 0,030	0,67 $\pm$ 0,10	0,981
40	1,680	0,090 $\pm$ 0,018	0,78 $\pm$ 0,19	1,050
50	1,842	0,089 $\pm$ 0,060	0,93 $\pm$ 0,23	0,921



**Figura 4.62:** Tempo de correlação rotacional  $\theta$  obtido a partir dos ajustes de decaimento da anisotropia de fluorescência do análogo MT-BODIPY em função da concentração em solução com vesículas de DPPC (1 mM) em temperatura de 50°C.

## CAPÍTULO 5. CONCLUSÕES

A miltefosina (MT), também chamada de hexadecilfosfocolina, pertence ao grupo das fosfocolinas de cadeia única, com características dos lipídios naturais, e espera-se que possuam a funcionalidade do grupo fosfocolina (PC). Possui atividade antifúngica e antibacteriana, e atividade anti-leishmania comprovada. Apresenta uma “cabeça” zwitteriônica, composta por um grupo fosforil negativo e um grupo colina positivo, e uma cadeia hidrocarbônica com 16 carbonos, o que leva à formação de micelas ao invés de bicamadas. Neste trabalho fizemos a determinação da concentração micelar crítica (cmc) da MT por métodos baseados em medidas de tensão superficial e de fluorescência. Examinamos também a interação entre a MT e vesículas de fosfolipídios, monitorando a fluorescência da sonda lipofílica 2-amino-n-hexadecil-benzamida (Ahba). Estudamos ainda o derivado fluorescente da MT com o grupo fluorescente BODIPY ligado à cauda hidrocarbônica da MT (MT-BODIPY), determinando sua cmc e propriedades de sua interação com vesículas de fosfolipídios.

### 5.1 Tensão Superficial e Espalhamento

Fizemos a determinação da concentração micelar crítica (cmc) pelo método da gota pendente, baseado na mudança da tensão superficial de uma gota de solução do anfifílico com o aumento da concentração do anfifílico até a concentração na qual ocorre a formação de micelas. O procedimento era de formar a gota da solução de tampão apenas, e uma solução concentrada de MT era adicionada com uma microsseringa na gota de tampão já formada, e, utilizando um *software* do equipamento, eram obtidos a tensão superficial e o volume da gota, e a concentração de MT na gota após a diluição era calculada. Os valores de cmc da MT que obtivemos, na temperatura de 25°C, foram: 60  $\mu\text{M}$  em água Milli-Q, 50  $\mu\text{M}$  em tampão fosfato 10 mM (pH 7,4) e 35  $\mu\text{M}$  em tampão com adição de 150 mM de NaCl. Os resultados estão dentro da faixa de valores reportados na literatura, cuja variabilidade decorre de diferentes métodos utilizados e diferentes condições do meio em que ocorre a micelização.

Foram feitas medidas de espalhamento dinâmico de luz para determinar o tamanho dos agregados de MT formados. A concentração de MT utilizada foi de 2 mM e observamos que a maioria dos agregados tem um diâmetro em torno de 100 nm, mas também foram encontrados diâmetros em torno de 5 e de 20 nm. Isso sugere que, para a concentração utilizada nos

experimentos, bem acima da cmc, há formação de agregados não esféricos, com tamanhos diferentes nas três dimensões, sendo a maior dimensão da ordem de 100 nm, a menor de 5 nm e a intermediária de 20 nm.

## 5.2 Fluorescência em Sistemas com MT e Ahba

Não se notaram grandes alterações nas bandas de absorção da sonda fluorescente Ahba na presença da MT. A característica hidrofóbica da cadeia alifática da sonda Ahba resulta em uma solubilidade em água muito baixa, e a banda mais próxima do visível obtida está centrada em 335 nm, valor que concorda com o obtido anteriormente [46]. O deslocamento da posição da banda de absorção em relação ao obtido em etanol (316 nm) é atribuído à formação de agregados da sonda em meio aquoso.

Os espectros de fluorescência da sonda Ahba em meio aquoso são de baixa intensidade, devido à auto-supressão que ocorre nos agregados. Os monômeros de MT adicionados vão para esses agregados, formando agregados mistos, o que provoca o crescimento do sinal de fluorescência do Ahba e o deslocamento espectral do máximo de fluorescência. Acima da cmc da MT formam-se agregados do anfifílico, e a sonda Ahba se dissolve nesses novos agregados. As alterações de intensidade da fluorescência e do pico de emissão permitem estimar um valor de 30  $\mu\text{M}$  para a cmc da MT em tampão com 150 mM NaCl, em concordância com os resultados de medidas de tensão superficial.

Medidas de anisotropia de fluorescência da sonda Ahba em presença de MT podem ser interpretadas segundo o mesmo modelo apresentado acima. Na ausência de MT a anisotropia medida corresponde à dos agregados de Ahba e ao acrescentar pequenas concentrações de MT, as moléculas do anfifílico vão para os agregados de Ahba, que aumentam de tamanho, com conseqüente crescimento da anisotropia de fluorescência. Acima da cmc, formam-se agregados de MT, onde se dissolve a sonda Ahba, diminuindo a anisotropia de fluorescência. O valor da cmc da MT em tampão fosfato 10 mM (pH 7,4) é aproximadamente 50  $\mu\text{M}$ , comparável ao obtido pelos métodos de tensão superficial. Em tampão fosfato contendo 150 mM de NaCl, os dados indicam cmc próxima de 20  $\mu\text{M}$ , valor abaixo do encontrado pelo método da gota pendente, mas que concorda com a diminuição da cmc devido à adição de sal na solução.

Foram ainda monitoradas as propriedades fluorescentes da sonda Ahba incorporada em vesículas de DMPC e DPPC, em presença da MT. Os vários parâmetros analisados - posição

espectral e intensidade da emissão, anisotropia de estado estacionário, decaimento da intensidade de emissão e decaimento da anisotropia, mostraram pequena variação com o acréscimo de MT, até razões molares de 1:20 em relação à concentração do fosfolípídios. Como o grupo fluorescente da sonda está localizado na região das cabeças polares das vesículas, os resultados mostram que as alterações produzidas pela miltefosina na bicamada lipídica não afetam a região da interface.

### 5.3 Análogo Fluorescente MT-BODIPY

Em etanol observam-se bandas de absorção típicas do grupo fluorescente BODIPY, com pico em 529 nm, e um ombro em 502 nm, com crescimento linear da absorbância nos dois comprimentos de onda com a concentração de MT-BODIPY. Em tampão fosfato 10 mM (pH 7,4), o pico em 502 nm é bastante pronunciado e a razão entre os picos é bem maior que a observada em etanol. Os espectros mostram que, enquanto em etanol o composto está na forma monomérica, em meio aquoso ele apresenta-se na forma de agregados, sendo que a cmc do MT-BODIPY tem valor em torno de 10  $\mu$ M.

O espectro de emissão fluorescente do MT-BODIPY apresenta máximo em 542 nm, que se desloca para 550 nm com o aumento da concentração. Esse efeito surge do fato de que em altas concentrações há um aumento da absorbância na banda centrada em 529 nm e que se estende até 550 nm, o que tem maior efeito sobre a emissão em 542 nm, comparada com a banda em 550 nm. A emissão fluorescente do composto em meio aquoso difere daquela em etanol, com o surgimento de uma banda centrada em 566 nm com o aumento da concentração, além da banda centrada em 537 nm. Os resultados são coerentes com as observações feitas por absorção óptica, indicando que, em meio aquoso, o MT-BODIPY se agrega em concentrações da ordem de 10  $\mu$ M.

As medidas de anisotropia em estado estacionário mostram grande mobilidade do composto em etanol, meio em que estaria na forma monomérica, e valores maiores de anisotropia em meio aquoso, onde forma agregados já em concentrações de 10  $\mu$ M. Já o decaimento da anisotropia em meio aquoso mostra tempos de correlação rotacional  $\theta$  na faixa de 300 ps, que indicam uma difusão rotacional rápida da molécula. Por outro lado, valores de anisotropia no infinito ( $A_\infty$ ) diferentes de zero indicam que existem restrições à rotação da molécula, possivelmente pela sua presença em agregados.

Finalmente, estudamos os parâmetros da emissão fluorescente do MT-BODIPY incorporado em vesículas de DMPC e DPPC. Contrariamente ao observado nos experimentos com Ahba e MT em vesículas, verificamos que a posição espectral e a intensidade da emissão, anisotropia de estado estacionário, decaimento da intensidade de emissão e decaimento da anisotropia são drasticamente alterados com o aumento da concentração do análogo fluorescente da MT nas vesículas de fosfolípidios. Os resultados mostram que o MT-BODIPY produz alterações que aumentam o grau de desordem da bicamada, o que não havia sido observado nos experimentos com a sonda Ahba. Como o grupo fluorescente na MT-BODIPY localiza-se na parte final da cadeia alifática, concluímos que o efeito da MT sobre as vesículas lipídicas é o desordenamento das bicamadas na região das caudas apolares.

## REFERÊNCIAS

- [1] WHO, *World Health Organization. Control of Neglected Tropical Diseases (NTD)*. 2007.
- [2] HOTEZ, P. J. et al., *The Neglected Tropical Diseases of Latin America and the Caribbean: A Review of Disease Burden and Distribution and a Roadmap for Control and Elimination*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2, n. 9, p. e300, 2008.
- [3] MISHRA, B. B. et al., *Alkaloids: Future prospective to combat leishmaniasis*. **Fitoterapia**, v. 80, n. 2, p. 81-90, 2009.
- [4] BRASIL, *Ministério da Saúde. Secretaria da Vigilância em Saúde: Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral*. 2003.
- [5] GETTI, G. T.; CHEKE, R. A.; HUMBER, D. P., *Induction of apoptosis in host cells: a survival mechanism for Leishmania parasites?* **Parasitology**, v. 135, n. 12, p. 1391-1399, 2008.
- [6] DE SOUZA, R. O. M. A. et al., *High selective leishmanicidal activity of 3-hydroxy-2-methylene-3-(4-bromophenyl)propanenitrile and analogous compounds*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 1, p. 99-102, 2007.
- [7] BRASIL, *Ministério da Saúde. Secretaria da Vigilância em Saúde: Leishmaniose visceral grave: normas e condutas*, in *Série A. Normas e Manuais Técnicos*. 2006: Brasília.
- [8] CHAPPUIS, F. et al., *Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control?* **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 873-882, 2007.
- [9] DESJEUX, P. et al., *Leishmaniasis*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 9, p. 692-693, 2004.
- [10] SOTO, J.; BERMAN, J., *Treatment of New World cutaneous leishmaniasis with miltefosine*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, p. S34-S40, 2006.
- [11] SOTO, J. et al., *Treatment of Bolivian mucosal leishmaniasis with miltefosine*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. 3, p. 350-356, 2007.

- [12] RAKOTOMANGA, M.; LOISEAU, P. M.; SAINT-PIERRE-CHAZALET, M., *Hexadecylphosphocholine interaction with lipid monolayers*. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes**, v. 1661, n. 2, p. 212-218, 2004.
- [13] DESJEUX, P., *Leishmaniasis: current situation and new perspectives*. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.
- [14] PINHEIRO, R. O. et al., *Protection against cutaneous leishmaniasis by intranasal vaccination with lipophosphoglycan*. **Vaccine**, v. 25, n. 14, p. 2716-2722, 2007.
- [15] CHAGAS, E., *Visceral leishmaniasis in Brazil*. **Science**, v. 84, p. 397-398, 1936.
- [16] HOTEZ, P. J., *The Giant Anteater in the Room: Brazil's Neglected Tropical Diseases Problem*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2, n. 1, p. e177, 2008.
- [17] SÃO PAULO, *Plano Estadual de Saúde 2008-2011*. 2008.
- [18] BRYCESON, A. D. M., *Preface*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, p. S1-S3, 2006.
- [19] PANDEY, K. et al., *Pharmacotherapeutic Options for Visceral Leishmaniasis - Current Scenario*. **Clinical Medicine Insights: Pathology**, 2009.
- [20] DORLO, T. P. C. et al., *Development and validation of a quantitative assay for the measurement of miltefosine in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 865, n. 1-2, p. 55-62, 2008.
- [21] MURRAY, H. W. et al., *Advances in leishmaniasis*. **Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, 2005.
- [22] CARVALHO, S. F. G., *Utilização de baixas doses de Desoxicolato de Anfotericina B no tratamento da leishmaniose visceral em crianças e adolescentes*, in *Faculdade de Medicina*. 2000, Universidade Federal de Minas Gerais: Minas Gerais. p. 107.
- [23] CROFT, S. L.; ENGEL, J., *Miltefosine - discovery of the antileishmanial activity of phospholipid derivatives*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, p. S4-S8, 2006.
- [24] MARCO, C. et al., *Hexadecylphosphocholine alters nonvesicular cholesterol traffic from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum and inhibits the synthesis of*

*sphingomyelin in HepG2 cells*. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 41, n. 6, p. 1296-1303, 2009.

[25] SUNDAR, S. et al., *Oral miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, p. S26-S33, 2006.

[26] CROFT, S. L.; SEIFERT, K.; DUCHENE, M., *Antiprotozoal activities of phospholipid analogues*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 126, n. 2, p. 165-172, 2003.

[27] LOISEAU, P. M.; BORIES, C., *Mechanisms of drug action and drug resistance in Leishmania as basis for therapeutic target identification and design of antileishmanial modulators*. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 5, p. 539-550, 2006.

[28] BERMAN, J. et al., *Miltefosine: issues to be addressed in the future*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, p. S41-S44, 2006.

[29] NWAKA, S. *Prospective antimalarial drug discovery and development*. In *Report of the Scientific Working Group on Malaria*. 2003. Geneva.

[30] KAMINSKY, R., *Miltefosine (Zentaris)*. **Current Opinion in Investigational Drugs**, v. 3, p. 550-554, 2002.

[31] GUTTERIDGE, W. E., *TDR collaboration with the pharmaceutical industry*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, p. S21-S25, 2006.

[32] KHADEMVATAN, S. et al., *Induction of Apoptosis by Miltefosine in Iranian Strain of Leishmania infantum Promastigotes*. **Iranian Journal of Parasitology**, v. 4, n. 2, p. 23-31, 2009.

[33] PARIS, C. et al., *Miltefosine induces apoptosis-like death in Leishmania donovani promastigotes*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 852-859, 2004.

[34] DAS, V. N. R. et al., *Short Report: Development of Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis (PKDL) Miltefosine-Treated Visceral Leishmaniasis*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 3, p. 336-338, 2009.

[35] MRAVLJAK, J.; ZEISIG, R.; PECAR, S., *Synthesis and biological evaluation of spin-labeled alkylphospholipid analogs*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 20, p. 6393-6399, 2005.

- [36] URBINA, J. A., *Mechanisms of action of lysophospholipid analogues against trypanosomatid parasites*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, p. S9-S16, 2006.
- [37] STAFFORD, R. E.; FANNI, T.; DENNIS, E. A., *Interfacial Properties and Critical Micelle Concentration of Lysophospholipids*. **Biochemistry**, v. 28, n. 12, p. 5113-5120, 1989.
- [38] YASEEN, M. et al., *The structure of zwitterionic phosphocholine surfactant monolayers*. **Langmuir**, v. 22, n. 13, p. 5825-5832, 2006.
- [39] QUESADA, E. et al., *Fluorescent phenylpolyene analogues of the ether phospholipid edelfosine for the selective labeling of cancer cells*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 22, p. 5333-5335, 2004.
- [40] SAUGAR, J. M. et al., *Synthesis and biological evaluation of fluorescent leishmanicidal analogues of hexadecylphosphocholine (miltefosine) as probes of antiparasite mechanisms*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 24, p. 5994-6003, 2007.
- [41] MCGRATH, J. C.; ARRIBAS, S.; DALY, C. J., *Fluorescent ligands for the study of receptors*. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 17, n. 11, p. 393-399, 1996.
- [42] MCGRATH, J. C.; DALY, C. J., *Do fluorescent drugs show you more than you wanted to know?* **British Journal of Pharmacology**, v. 139, n. 2, p. 187-189, 2003.
- [43] GIEPMANS, B. N. G. et al., *Review - The fluorescent toolbox for assessing protein location and function*. **Science**, v. 312, n. 5771, p. 217-224, 2006.
- [44] HORNILLOS, V. et al., *Synthesis of BODIPY-labeled alkylphosphocholines with leishmanicidal activity, as fluorescent analogues of miltefosine*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 24, p. 6336-6339, 2008.
- [45] CARUSO, F. et al., *Lateral Diffusion of Amphiphiles in Fatty-Acid Monolayers at the Air-Water-Interface - a Steady-State and Time-Resolved Fluorescence Quenching Study*. **Langmuir**, v. 9, n. 11, p. 3142-3148, 1993.
- [46] MARQUEZIN, C. A. et al., *Spectroscopic characterization of 2-amino-N-hexadecylbenzamide (AHBA), a new fluorescence probe for membranes*. **Biophysical Chemistry**, v. 124, n. 2, p. 125-133, 2006.
- [47] NELSON, D. L.; COX, M. M., *Lehninger: Princípios de Bioquímica*. 3a. ed. 2002, São Paulo: Savier.

- [48] JONES, M. N.; CHAPMAN, D., *Micelles, Monolayers, and Biomembranes*. 1995: Wiley-Liss.
- [49] ANIANSSON, E. A. G. et al., *Theory of Kinetics of Micellar Equilibria and Quantitative Interpretation of Chemical Relaxation Studies of Micellar Solutions of Ionic Surfactants*. **Journal of Physical Chemistry**, v. 80, n. 9, p. 905-922, 1976.
- [50] GEHLEN, M. H.; DESCHRYVER, F. C., *Time-Resolved Fluorescence Quenching in Micellar Assemblies*. **Chemical Reviews**, v. 93, n. 1, p. 199-221, 1993.
- [51] SHAW, D. J., *Introdução à Química dos Colóides e de Superfícies*. 1975, São Paulo: Blücher: Editora da Universidade de São Paulo.
- [52] CANTOR, C. R.; SCHIMMEL, P. R., *Biophysical Chemistry. Part III: The behavior of biological macromolecules*. Vol. III. 1980: W. H. Freeman and Company.
- [53] PALLADINO, P.; ROSSI, F.; RAGONE, R., *Effective Critical Micellar Concentration of a Zwitterionic Detergent: A Fluorimetric Study on n-Dodecyl Phosphocholine*. **Journal of Fluorescence**, v. 20, n. 1, p. 191-196, 2010.
- [54] ALBERTS, B. et al., *Biologia Molecular da Célula*. 3a. ed. 1997: Artes Médicas.
- [55] KATSARAS, J.; RAGHUNATHAN, V. A., *Aligned Lipid-Water Systems*, In *Lipid Bilayers: Structure and Interactions*, KATSARAS, J. e GUTBERLET, T., 2001, Springer.
- [56] LASIC, D. D., *Liposomes in Gene Delivery*. 1997: CRC Press.
- [57] SZOKA, F.; PAPAHDJOPOULOS, D., *Comparative Properties and Methods of Preparation of Lipid Vesicles (Liposomes)*. **Annual Review of Biophysics and Bioengineering**, v. 9, p. 467-508, 1980.
- [58] HOPE, M. J. et al., *Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 812, n. 1, p. 55-65, 1985.
- [59] NAGLE, J. F.; TRISTRAM-NAGLE, S., *Bilayers and Fluctuations*, In *Lipid Bilayers: Structure and Interactions*, KATSARAS, J. e GUTBERLET, T., 2001, Springer.
- [60] BASHFORTH, S.; ADDAMS, J. C., *An Attempt to Test the Theory of Capillary Action*. 1883: Cambridge University Press.

- [61] ARASHIRO, E. Y.; DEMARQUETTE, N. R., *Use of the pendant drop method to measure interfacial tension between molten polymers*. **Materials Research**, v. 2, p. 23-32, 1999.
- [62] DEMARQUETTE, N. R.; KAMAL, M. R., *Comparaçãõ entre o Método da Gota Pendente e o Método da Gota Girante para Medida da Tensão Interfacial entre Polımeros*. **Polımeros: Ciência e Tecnologia**, v. jul/set, 1997.
- [63] CANTOR, C. R.; SCHIMMEL, P. R., *Biophysical Chemistry. Part II: Techniques for the study of biological structure and function*. Vol. II. 1980: W. H. Freeman and Company.
- [64] ZETASIZER, 1996.
- [65] ATKINS, P., *Físico-Química*. 6a. ed. Vol. 2. 1997: LTC.
- [66] LOUDET, A.; BURGESS, K., *BODIPY dyes and their derivatives: Syntheses and spectroscopic properties*. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 11, p. 4891-4932, 2007.
- [67] LAKOWICZ, J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 2a. ed. 1999: Kluwer Academic/ Plenum Publishers.
- [68] TURCHIELLO, R. F. et al., *Ortho-aminobenzoic acid-labeled bradykinins in interaction with lipid vesicles: Fluorescence study*. **Biopolymers**, v. 65, n. 5, p. 336-346, 2002.
- [69] RISKE, K. A.; AMARAL, L. Q.; LAMY-FREUND, M. T., *Thermal transitions of DMPG bilayers in aqueous solution: SAXS structural studies*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1511, n. 2, p. 297-308, 2001.
- [70] DATAPHYSICS, *Optical Contact Angle Measuring Instruments*.
- [71] DE CASTRO, B. et al., *Interaction of drugs with hexadecylphosphocholine micelles. Derivative spectroscopy, acid-base and solubility studies*. **Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems**, v. 18, n. 1-2, p. 71-78, 2001.
- [72] SOARESDEARAUJO, P. et al., *Structure and Thermodynamic Properties of the Complexes between Phospholipase a2 and Lipid Micelles*. **Biochemistry**, v. 18, n. 4, p. 580-586, 1979.
- [73] RAKOTOMANGA, M.; SAINT-PIERRE-CHAZALET, M.; LOISEAU, P. M., *Alteration of fatty acid and sterol metabolism in miltefosine-resistant Leishmania donovani promastigotes and consequences for drug-membrane interactions*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 7, p. 2677-2686, 2005.

- [74] GOMEZ-SERRANILLOS, I. R. et al., *Study of the pi-A isotherms of miltefosine monolayers spread at the air/water interface*. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 6, n. 7, p. 1580-1586, 2004.
- [75] KANG, E. C.; KATAOKA, S.; KATO, K., *Synthesis and properties of alkyl phosphorylcholine amphiphiles with a linear and an asymmetrically branched alkyl chain*. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 78, n. 8, p. 1558-1564, 2005.
- [76] MACDONALD, P. M. et al., *Synthesis and Characterization of a Homologous Series of Zwitterionic Surfactants Based on Phosphocholine*. **Langmuir**, v. 7, n. 11, p. 2602-2606, 1991.
- [77] TANFORD, C., *The Hydrophobic Effect, Formation of Micelles and Membranes*. 2a. ed. 1980, New York: Wiley.
- [78] AGGARWAL, L. P. F.; BORISSEVITCH, I. E., *On the dynamics of the TPPS4 aggregation in aqueous solutions: Successive formation of H and J aggregates*. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 63, n. 1, p. 227-233, 2006.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)