UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE FÍSICA

MARINA BERARDI BARIONI

**Propriedades estruturais de membranas modelo
em interação com o composto anti-*Leishmania* miltefosina**

Ribeirão Preto – SP

2014

MARINA BERARDI BARIONI

**Propriedades estruturais de membranas modelo
em interação com o composto anti-*Leishmania* miltefosina**

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Física Aplicada à Medicina e Biologia.

Orientador: Prof. Dr. Amando Siuiti Ito

VERSÃO CORRIGIDA

Ribeirão Preto – SP

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Barioni, Marina Berardi.

“Propriedades estruturais de membranas modelo em interação com o composto anti-*Leishmania* miltefosina”. Ribeirão Preto, 2014.
141 p.: il.; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo. Área de concentração: Física Aplicada à Medicina e Biologia, 2014.

Orientador: Ito, Amando Siuiti.

1. Miltefosina (hexadecilfosfocolina). 2. Membranas modelo. 3. Leishmaniose. 4. Espectroscopia de fluorescência. 5. Microscopia de fluorescência

BARIONI, M. B. **Propriedades estruturais de membranas modelo em interação com o composto anti-*Leishmania* miltefosina**. 2014. 141 p. Tese (Doutorado – Programa de pós-graduação em Física Aplicada à Medicina e Biologia).

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2014.

ERRATA

Folha	Linha	Onde se lê	Leia-se
--------------	--------------	-------------------	----------------

Nome: BARIONI, Marina Berardi

Título: Propriedades estruturais de membranas modelo em interação com o composto anti-*Leishmania* miltefosina

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 22/09/2014 .

Banca Examinadora

Prof. Dr. Amando Siuiti Ito

Instituição: Departamento de Física – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Antônio José da Costa Filho

Instituição: Departamento de Física – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Pietro Ciancaglini

Instituição: Departamento de Química – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

Dra. Lucimara Perpetua Ferreira Aggarwal

Instituição: Departamento de Física – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Karin do Amaral Riske

Instituição: Departamento de Biofísica – Universidade Federal de São Paulo

À minha mãe e amiga Elisete, pela oportunidade de seguir no caminho que eu escolhi e pelo apoio incondicional, e ao meu marido André, pelo companheirismo, compreensão e apoio, sempre.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Amando, em primeiro lugar, pela oportunidade oferecida, pela orientação e apoio ao longo desses quatro longos e ao mesmo tempo corridos anos.

Aos colegas do Laboratório de Fotobiofísica, Larissa Montaldi “Morango”, Érika Ribeiro e Silva, Wallance Pazin, Jonas Gitz “Taz”, Gustavo “Pudimm” e à agregada Amanda Rech, pelos almoços no restaurante universitário, pelos cafés e conversas pós-almoço, idas à cantina, happy hours, em especial ao Gustavo, pelas discussões científicas, ao professor Iouri pela participação na banca de qualificação e ao Wallance pela divisão das tarefas de cuidado com o laboratório.

Aos amigos, Ivana, Stela, Aline, Amanda, Érika, Pudimm e Carla, Jorge e Thereza, simplesmente pela amizade.

À minha família, essencial na minha formação. Em especial em memória do meu avô, pela admiração e carinho, da minha tia Edna, pela força e exemplo, mas principalmente da minha avó, pela ajuda na minha criação e pelo apoio irrestrito. Apesar das saudades, as boas lembranças sempre me servirão de consolo.

Ao meu pai Eduardo, pela admiração, mesmo que velada.

À minha mãe Elisete, que sempre me apoiou e não me deixou desistir. Sem ela não teria tido a oportunidade de seguir esse caminho e chegar até aqui.

Ao meu irmão Vitor, pelas brigas, sempre terminadas com um abraço nem sempre consentido, e pelas conversas e conselhos nos momentos difíceis, além da companhia essencial durante parte da minha estadia em Berlim.

Ao meu namorado André, que se tornou meu marido ao longo dessa etapa, sempre companheiro, amigo, paciente, apoiando os meus sucessos e evitando meus fracassos, pensando sempre no meu futuro e me acompanhando em todos os passos da minha carreira. Por ter me acompanhado em metade da estadia em Berlim e por ter apoiado e suportado a separação física na outra metade.

Aos meus sogros, Marilda e Nelson, e cunhados Felipe e Rafael, pelo apoio e pelo carinho.

Aos técnicos de laboratório, Carlão e Adriano, pelo apoio na preparação de amostras.

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

À ex-aluna de iniciação científica Larissa, que ajudou na execução dos experimentos de FLIM e FCS com LUVs e GUVs.

À Prof. Karin A. Riske, do Departamento de Biofísica da Unifesp em São Paulo, pelo auxílio na preparação das GUVs e nos experimentos de microscopia de contraste de fase e de fluorescência.

À Juliana Sakamoto, aluna do Prof. Pietro Ciancaglini, pelo auxílio nos experimentos de DSC.

À Ana Paula Ramos, hoje Professora, e à Prof. Bete Zaniquelli, pelo auxílio nos experimentos de DLS.

Ao grupo do Professor Andreas Herrmann, do Grupo de Biofísica Molecular, Instituto de Biologia, Universidade Humboldt de Berlim, onde passei 6 meses desses 4 anos aprendendo e trocando experiências. Em especial ao Dr. Thomas Korte, pelo auxílio técnico com os microscópios confocais e as medidas de FLIM, ao Ivan Haralampiev, pelo auxílio na preparação das vesículas e execução dos experimentos de microscopia confocal e ensaio de ditionito e discussão dos experimentos, ao Dr. Peter Müller, pela orientação e auxílio nos experimentos de ressonância paramagnética eletrônica, ao Matthias Schade, pelas discussões sobre os meus resultados, ao Dr. Salvatore Chiantia, pela orientação para preparação das bicamadas lipídicas suportadas, realização dos experimentos de espectroscopia de correlação de imagem de quadriculação e pelo programa desenvolvido por ele em Matlab para a análise dos resultados, à Chris Höfer pela amizade, à Sabine Schiller pelo apoio técnico, e finalmente ao Prof. Andreas Herrmann, pela orientação, discussão do projeto, dos experimentos e resultados, e pela oportunidade de realização do estágio em Berlim em um grupo com vasta experiência no estudo por espectroscopia e microscopia de fluorescência de interação com membranas modelo. Também agradeço a todos os membros do grupo pelos almoços e pela disposição em conversar em inglês a maior parte do tempo.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), que através do Programa Ciência sem Fronteiras (CsF), a partir do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fluidos Complexos (INCT-FCx), financiou o período de estágio de doutorado sanduíche no laboratório do Professor Andreas Herrmann na Universidade Humboldt de Berlim.

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

À Capes pelo financiamento de uma pequena parte do período do doutorado.

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.

*„Es gibt Männer, die kämpfen für einen Tag und sind gut,
andere Kämpfen ei Jahr und sind besser
und es gibt jene, die viele Jahre Kämpfen und sehr gut sind,
aber die, die ihr ganzes Leben lang kämpfen,
dass sind diejenigen, die unersetzbar sind“*

Bertold Brecht

Tradução: "Há homens que lutam por um dia e são bons, outros que lutam um ano e são melhores, e aqueles que têm muitos anos de luta são muito bons, mas aqueles que lutam toda a vida são os únicos insubstituíveis"

RESUMO

BARIONI, M. B. **Propriedades estruturais de membranas modelo em interação com o composto anti-*Leishmania* miltefosina**. 2014. 141 p. Tese (Doutorado – Programa de pós-graduação em Física Aplicada à Medicina e Biologia) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2014.

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada causada por diferentes espécies do gênero *Leishmania* que atinge grande parte da população mais pobre do mundo e sua manifestação visceral, que é fatal se não tratada, tem se alastrado atingindo grandes cidades, aumentando o número de pessoas com risco de infecção. Dentre os medicamentos em uso, está o análogo lipídico sintético hexadecilfosfolina (miltefosina), administrado oralmente, que age nas membranas celulares do parasita e pode induzir apoptose, mas com modo de ação não totalmente esclarecido. O primeiro local de interação desse fármaco é a membrana celular do parasita, sendo importante o conhecimento da sua forma de interação. Neste trabalho examinamos propriedades de diversos modelos de membrana com diferentes composições, levando em consideração o conhecimento existente sobre a composição da membrana plasmática da *Leishmania*. Assim, as membranas modelo foram vesículas unilamelares grandes e gigantes (LUVs e GUVs), de fosfolipídios puros, de misturas binárias com fosfolipídios e colesterol e ainda misturas ternárias com ceramida, um esterol presente nas membranas de *Leishmania*. A interação com a miltefosina foi estudada em diferentes intervalos de concentração do fármaco. Como técnicas principais utilizamos a espectroscopia de fluorescência, estática e resolvida no tempo, a espectroscopia de correlação de fluorescência, microscopia de fluorescência e confocal e imagens por tempo de vida de fluorescência. Observou-se que a interação entre o fármaco e as membranas lipídicas ocorre de diferentes formas, dependendo i) da razão molar entre o fármaco e os lipídios; ii) da concentração real do fármaco, se abaixo ou acima da concentração micelar crítica (CMC); iii) da composição do modelo de membrana e da fase lipídica da bicamada. Em concentrações abaixo da CMC, a miltefosina tem efeito de fluidificação das bicamadas, principalmente quando elas se encontram em na fase gel, mas esse efeito é pouco pronunciado na presença de colesterol, pois esse composto protege a bicamada do efeito do fármaco. Em vesículas de misturas ternárias de fosfolipídio, colesterol e ceramida em alta concentração, não há separação de fases, e a presença de 10 mol% de miltefosina promove a formação de domínios de ceramida; nas vesículas em que a ceramida está em concentração molar mais baixa,

formando domínios, a separação de fases fica menos evidente com o acréscimo de miltefosina. Em razões de concentração miltefosina/lipídio elevadas, mas ainda abaixo da CMC, observa-se diminuição no tamanho das vesículas, por formação de agregados de fármaco/lipídio com porções da bicamada. Em concentrações acima da CMC, ocorrem efeitos drásticos com solubilização de partes cada vez maiores da bicamada da membrana, e esses efeitos ocorrem em tempos menores quanto maior a concentração de miltefosina. Portanto, de maneira geral, o colesterol protege a bicamada do efeito da miltefosina, mas o fármaco tem efeito pronunciado em modelos de membrana de misturas ternárias contendo ceramida. Os efeitos variam com a concentração da miltefosina, com aumento da fluidez da bicamada em baixas razões fármaco/lipídios, solubilização de pequenas porções da bicamada e diminuição do tamanho das vesículas em razões maiores, mas ainda abaixo da CMC, e acima da CMC, formação de agregados do fármaco com porções dos lipídios da bicamada e fragmentação da membrana.

Palavras-chave: 1. Miltefosina (hexadecilfosfocolina). 2. Membranas modelo. 3. Leishmaniose. 4. Espectroscopia de fluorescência. 5. Microscopia de fluorescência.

ABSTRACT

BARIONI, M. B. **Structural properties of model membranes in interaction with the leishmanicidal compound miltefosine.** 2014. 141 p. Thesis (PhD – Postgraduate program in Physics applied to Medicine and Biology).
Faculty of Philosophy, Sciences and Literature, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2014.

Leishmaniasis is a complex of diseases part of the neglected tropical diseases caused by several species of the genus *Leishmania*. It reaches a large part of the poorest people in the world and its visceral form, which is fatal if left untreated, has been spread around big cities, increasing the number of people at risk of infection. Among the used drugs for the treatment, there is the synthetic lipid analogue hexadecylphosphocholine (miltefosine), orally administrated, which acts in the cell membranes and can induce apoptosis like death, but its mechanism of action is not totally clear. The first interaction's site of this drug is the cell membrane, and it is important to know its mechanism of interaction. In this work we explore properties of several membrane models with different compositions, taking into account the existent knowledge about the composition of the *Leishmania* plasma membrane. Therefore, the model membranes were giant and large unilamellar vesicles (GUVs and LUVs), formed from pure phospholipids, binary mixtures of phospholipids and cholesterol and ternary mixtures with ceramide, a sterol present in the *Leishmania* membranes. The interaction with miltefosine was studied in different intervals of drug concentration. The main techniques used were the steady-state and time-resolved fluorescence spectroscopy, fluorescence correlation spectroscopy, confocal and fluorescence microscopy and fluorescence lifetime imaging. The interaction depends on i) the molar ratio of drug and lipids; ii) the real concentration of the drug, if it is below or above the critical micelle concentration (CMC); iii) the composition of the model membrane and the lipid phase of the bilayer. In concentration below the CMC, miltefosine has an effect of bilayer fluidization, mainly when it is in a more ordered phase, but this effect is less pronounced in cholesterol presence, because this compound protects the bilayers from the drug effect. In vesicles from ternary mixtures of phospholipid, cholesterol and ceramide in high concentration, there is no phase separation, and the presence of 10 mol% of miltefosine promotes ceramide domains formation; in vesicles in which ceramide is in low concentration, forming domains, the phase separation is less evident with miltefosine addition. In high concentration ratio miltefosine/lipids, but below CMC, it is observed a

decrease in vesicles size with drug/lipids aggregates formation from portion of the bilayer. In concentrations above the CMC, drastic effects occur, with solubilization of bigger portions of the membrane bilayer, and the effects occur in lower times for higher drug concentration. Therefore, generally, cholesterol protects bilayer from the effect of miltefosine, but the drug has a pronounced effect in model membranes of ternary mixtures containing ceramide. The effects vary with miltefosine concentration, increasing the bilayer fluidity in lower drug/lipid ratio, solubilization of small portions of the bilayer and decrease of vesicles size in higher ratios, but still below CMC, and above CMC, formation of aggregates of the drug with portions of bilayer lipids, and membrane fragmentation.

Keywords: 1. Miltefosine (hexadecylphosphocholine). 2. Model membranes. 3. Leishmaniasis. 4. Fluorescence spectroscopy. 5. Fluorescence microscopy.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Molécula da miltefosina, hexadecilfosfocolina. 29
- Figura 2: Distribuição dos lipídios da membrana plasmática de promastigotos da *L. major* de acordo com o grupo cabeça polar dos PLs. Adaptado de: (25). 31
- Figura 3: Esquema ilustrando as fases lipídicas de uma membrana modelo fosfolipídica e a influência da inserção do colesterol. Adaptado de: (49). 36
- Figura 4: Molécula dos fosfolipídios (a) DPPC (16:0 PC ou 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine), (b) POPC (16:0-18:1 PC ou 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine), (c) colesterol (de lã ovina > 98%), (d) ceramida (C16 ceramida ou N-palmitoyl-D-*erythro*-sphingosine). 40
- Figura 5: Molécula dos fosfolipídios marcados com a sonda fluorescente NBD (a) NBD-PE (16:0 NBD-PE ou 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) (sal de amônia)), (b) C6-NBD-PC (16:0-6:0 NBD-PC ou 1-palmitoyl-2-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl]-*sn*-glycero-3-phosphocholine) e (c) C12-NBD-PC (16:0-12:0 NBD-PC ou 1-palmitoyl-2-[12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]dodecanoyl]-*sn*-glycero-3-phosphocholine). 44
- Figura 6: Molécula do análogo fluorescente do fármaco MT, MT-EtBDP (6-et-BODIPY-11C-PC ou 11-(4,4-difluoro-6-etil-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacen-2-il)*n*-undecil-fosfatidil-colina). 45
- Figura 7: Molécula da sonda DiIC₁₈ (DiIC18(3) ou 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate). 46
- Figura 8: Esquema do experimento de destruição da fluorescência, pelo ditionito de sódio, da sonda NBD-PE, inserida em ambas as monocamadas, interna e externa, da bicamada das vesículas. 47
- Figura 9: Redução da sonda C6-NBD-PC localizada na monocamada externa de vesículas unilamelares pequenas (em inglês *small unilamellar vesicles*, SUVs) de DPPC a 10°C. Adaptado de: (88). 48
- Figura 10: Princípio da imagem confocal. O *pinhole* no plano intermediário da imagem assegura que somente o plano em foco da luz atinja o detector, o que permite a aquisição de imagens com resolução próxima ao limite de difração. Adaptado de: (93). 54
- Figura 11: Dados típicos obtidos em uma medida de FCS de uma solução com concentração de nanomolar: (a) traço de contagem molecular (*MCS trace*) e (b) função de autocorrelação de FCS e FLCS. 56
- Figura 12: Exemplo de espectro de ESR obtido e parâmetros a serem observados como largura de pico ΔH_0 , intensidade do pico principal, h_0 , e intensidade do pico h_{-1} . 64
- Figura 13: Lipídios marcados com sonda de spin doxyl. (a) 1-palmitoyl-2-(5-doxylstearoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine (5-doxyl-PC) e (b) 1-palmitoyl-2-(16-doxylstearoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine (16-doxyl-PC). 65

- Figura 14: Representação esquemática da sequência de eventos a partir da exposição de uma bicamada fosfolipídica (FL) a quantidades crescentes de surfactante (S). Adaptado de: (33). 68
- Figura 15: Curva de DSC para LUVs de POPC/DPPC 1:1. 70
- Figura 16: Raio médio das LUVs de diferentes composições lipídicas com (vermelho) e sem (preto) MT (5 mol%), na presença de 2,5 mol% das sondas de spin (a) 5-doxy-PC e (b) 16-doxy-PC. 72
- Figura 17: Constante de acoplamento hiperfino (a) e tempo de correlação rotacional (b) das sondas 5-doxy-PC (preto) e 16-doxy-PC (vermelho) 2,5 mol% em LUVs de DPPC, na ausência (sólidos) e na presença (abertos) de MT, obtidas em temperaturas abaixo e acima da temperatura de transição do fosfolípido DPPC, desde 25°C até 50°C. 73
- Figura 18: Constante de acoplamento hiperfino da sonda 5-doxy-PC 2,5 mol% em LUVs de POPC puro (quadrados pretos), POPC/Col 9:1 (círculos vermelhos) e POPC/Col/Cer 8:1:1 (triângulos verdes), na ausência (sólidos) e na presença (abertos) de MT, obtidas desde 25°C até 50°C. 75
- Figura 19: (a) Tempos de vida, τ_i e (b) fatores pré-exponenciais, α_i , obtidos a partir do ajuste biexponencial (τ_1 , α_1 quadrados e τ_2 , α_2 círculos) dos perfis de decaimento da intensidade de fluorescência da sonda NBD-PE 1 mol% em LUVs de DMPC 1 mM a 15°C (sólido) e 35°C (aberto). $\lambda_{exc} = 460$ nm, $\lambda_{em} = 530$ nm. 77
- Figura 20: Efeito da MT no decaimento da sonda NBD-PE (5 μ M) em LUVs de DMPC 1 mM (aberto) e da sonda C6-NBD-PC em LUVs de DPPC 1 mM (sólido). Gráficos, em função da concentração de MT, da razão entre o tempo médio com adição de MT e o valor inicial sem MT. Temperaturas abaixo (15°C) (quadrados) e acima a transição de fase lipídica (35°C para DMPC e 55°C para DPPC) (círculos). 77
- Figura 22: Valores do tempo de vida mais longo das sondas NBD-PE (preto), C6-NBD-PC (vermelho), e C12-NBD-PC (azul) 0,5 mol% em sistema de LUVs de POPC/DPPC 1:1 em função da concentração de MT. 80
- Figura 22: Curvas de cinética da intensidade de fluorescência da sonda NBD-PE 0,5 mol% em LUVs de POPC (preto), POPC/Col 9:1 (vermelho) e POPC/Cer/Col 8:1:1 (verde) com adição de 50 mM de ditionito de sódio aos 30 s, e 0,5 mol% de Triton X-100 aos 300 s, (a) na ausência e (b) na presença de 5 mol% de MT. 81
- Figura 23: Curvas de cinética da intensidade de fluorescência da sonda NBD-PE 0,5 mol% em LUVs de POPC (preto), POPC/Col 9:1 (vermelho) e POPC/Cer/Col 8:1:1 (verde) após a adição de ditionito de sódio aos 30 s (a) adicionando 5 e 10 mol% de MT aos 120 e 210 s e (b) na presença de 5 mol% de MT e adicionando mais 5 mol% aos 165 s. 83
- Figura 24: Curvas de cinética da intensidade de fluorescência da sonda NBD-PE 0,5 mol% em LUVs de (a) POPC, (b) POPC/Col 9:1 e (c) POPC/Cer/Col 8:1:1 após a adição de ditionito de sódio aos 30 s, na ausência de MT (preto), adicionando 5 e 10 mol% de MT aos 120 e 210 s (verde), na presença de 5 mol% de MT (vermelho), e adicionando mais 5 mol% de MT aos 165 s (azul). 84
- Figura 25: Coeficientes de difusão menores das sondas NBD-PE (preto), C6-NBD-PC (vermelho) e C12-NBD-PC (verde), nas LUVs de POPC/DPPC 7:3 e efeito da adição de MT. 86

- Figura 26: Curvas de autocorrelação normalizadas de LUVs de POPC/Col 5:1 1 mM com as sondas NBD-PE (*preto*), C6-NBD-PC (*vermelho*) e C12-NBD-PC (*verde*) 0,5 mol% na ausência (*quadrados*) e na presença de 50 μ M de MT (*círculos*). 87
- Figura 27: Valor médio dos coeficientes de difusão D_1 (*preto*) e D_2 (*azul*) da sonda C12-NBD-PC em LUVs de POPC/Col 5:1 1 mM, na ausência e na presença de MT até 50 μ M, com seu respectivo desvio-padrão para, pelo menos, duas medidas. 88
- Figura 28: Espectros de absorção óptica do análogo fluorescente MT-EtBDP a 25°C em etanol em concentração de 10 e 20 μ M (*preto* e *vermelho*, respectivamente), e em solução tampão fosfato 10mM (pH 7,4) em concentrações de 4, 8 12,5, 15, 17,5 e 20 μ M (pico em 502 nm crescente), normalizadas pelo pico em 529 nm. 90
- Figura 29: Espectros de fluorescência do composto MT-EtBDP a 25°C (a) em etanol e (b) em solução tampão fosfato 10mM (pH 7,4) em concentrações de 2 (*preto*), 6 (*vermelho*), 15 (*verde*), 18 (*azul escuro*) e 20 μ M (*azul claro*) normalizadas pelo pico. $\lambda_{exc} = 505$ nm. 90
- Figura 30: Valores de anisotropia de fluorescência do composto MT-EtBDP em interação com vesículas de DMPC a 1 mM abaixo (15°C, *quadrados pretos*) e acima (25°C, *círculos vermelhos*) da temperatura de transição de fase do lipídio. Os valores são a média para 3 medidas, com seu respectivo desvio-padrão. $\lambda_{exc} = 505$ nm, $\lambda_{em} = 540$ nm. 92
- Figura 31: Dados do composto MT-EtBDP obtidos a partir das medidas de anisotropia resolvida no tempo: (a) tempo de correlação rotacional e (b) anisotropia no tempo inicial (*sólidos*) e anisotropia limite (final) (*abertos*), em interação com vesículas de DMPC a 1 mM, abaixo (15°C, *quadrados pretos*) e acima (25°C, *círculos vermelhos*) da temperatura de transição de fase do lipídio. $\lambda_{exc} = 505$ nm, $\lambda_{em} = 540$ nm. 93
- Figura 32: Imagens das GUVs de POPC obtidas por microscopia de contraste de fase, mostrando (a) a microseringa injetando a solução concentrada da droga miltefosina e (b)-(c) a perda de contraste quando a membrana tem sua integridade comprometida. 94
- Figura 33: Imagens de microscopia de fluorescência da sonda DiIC₁₈ 1 mol% em GUV de POPC, antes (a) e após (b) a injeção de solução de MT 3 mM. 94
- Figura 34: Imagens de GUVs de POPC por microscopia por contraste de fase, em solução de MT de 0,1 mM. Imagens (a) inicial, e após (b) 10 s e (c) 64,25 s. 95
- Figura 35: Imagens de GUVs de POPC por microscopia por contraste de fase, em solução de MT de 0,2 mM. Imagens (a) inicial, e após (b) 0,25 s, (c) 0,5 s e (d) 13,5 s. 95
- Figura 36: Imagens de GUVs de POPC por microscopia por contraste de fase, em solução de MT de 1 mM. Imagens (a) inicial, e após (b) 0,25 s e (c) 3 s. 96
- Figura 37: Imagens de GUVs de POPC por microscopia por contraste de fase, em solução de MT de 3 mM. Imagens (a) inicial, e após (b) 0,25 s e (c) 0,5 s. 96
- Figura 38: Imagens das GUVs de POPC/Col (7:3) obtidas por microscopia de contraste de fase, mostrando (a) a microseringa injetando a solução concentrada da droga miltefosina e (b)-(c) a perda de contraste quando a membrana tem sua integridade comprometida. 97
- Figura 39: Sequência de imagens de microscopia de fluorescência da sonda DiIC₁₈ 1 mol% em GUV de POP/Col (7:3), antes (a) e durante (b) a injeção de solução de MT 3 mM. Os índices 1 e 2 indicam duas GUVs diferentes. 97

- Figura 40: Imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% mesclada com imagem de DIC de GUVs de POPC a) sem MT, e com adição de b) 5, c) 10 e d) 20 mol% de MT. 99
- Figura 41: Imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% mesclada com imagem de DIC de GUVs de POPC/Col 7:3 a) sem MT, e com adição de b) 5, c) 10, d) 20, e) 50 e f) 100 mol% de MT. 100
- Figura 42: Imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% mesclada com imagem de DIC de GUVs de POPC/Col 7:3 feitas a) antes da adição de MT, b) 60 s após a adição de 5 mol% e c) 60 s após a adição de 10 mol%. 100
- Figura 43: Diagrama de fases de POPC, ceramida e colesterol, tendo destaque as regiões de fase fluida (F), e de coexistência das fases fluida e gel (F+G). Em destaque os pontos das composições POPC/Cer/Col 1:1:1 e 8:1:1. Adaptado de: (136). 101
- Figura 44: Imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% mescladas com imagens de DIC de GUVs de POPC/Cer/Col 1:1:1 a) sem MT e b) com 5 mol% de MT. 102
- Figura 45: Reconstrução tridimensional de imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% de GUVs de POPC/Col/Cer 1:1:1 a) sem MT e b) com 5 mol% de MT. 103
- Figura 46: Sequência de imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% mescladas com imagens de DIC de GUVs de POPC/Col/Cer 1:1:1 sem MT. Intervalo entre as imagens de 13,2 s. 103
- Figura 47: Sequência de imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% mescladas com imagens de DIC de GUVs de POPC/Col/Cer 1:1:1 com 5 mol% de MT. Intervalo entre as imagens de 26,3 s. 104
- Figura 48: Sequência de imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% mescladas com imagens de DIC de GUVs de POPC/Col/Cer 1:1:1 com 10 mol% de MT. Intervalo entre as imagens de 24,3 s. 104
- Figura 49: Sequência de imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% mescladas com imagens de DIC de GUVs de POPC/Col/Cer 1:1:1 com adição de 25 mol% de MT. Intervalo entre as imagens de 26,3 s. 105
- Figura 50: Imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% de GUVs de POPC/Col/Cer 1:1:1 (a) sem MT, e com adição de (b) 5, (c) 10, (d) 20 e (e) 50 mol% de MT. 105
- Figura 51: Imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% mescladas com imagens de DIC de GUVs de POPC/Col/Cer 1:1:1 (a) sem MT, e (b) com 10 mol% de MT. (c) Reconstrução tridimensional de imagens de (b) adquiridas ao longo do eixo z. 106
- Figura 52: Imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% mescladas com imagens de DIC de GUVs de POPC/Cer/Col 8:1:1 (a) sem MT, (b) com 5 mol% e (c) com 10 mol% de MT. 107

- Figura 53: Reconstrução tridimensional de imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% de GUVs de POPC/Col/Cer 8:1:1 (a) sem MT e com (b) 5 e (c) 10 mol% de MT. 107
- Figura 54: Sequência de imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% mescladas com imagens de DIC de GUVs de POPC/Col/Cer 8:1:1 sem MT. Intervalo entre as imagens de 26,3 s. 107
- Figura 55: Sequência de imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% mescladas com imagens de DIC de GUVs de POPC/Col/Cer 8:1:1 com 5 mol % de MT. Intervalo entre as imagens de 26,3 s. 108
- Figura 56: Sequência de imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% mescladas com imagens de DIC de GUVs de POPC/Col/Cer 8:1:1 com 10 mol% de MT. Intervalo entre as imagens de 26,3 s. 108
- Figura 57: Imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% de GUVs de POPC/Col/Cer 8:1:1 (a) sem MT, e com adição de (b) 5, (c) 10, (d) 20, (e) 50 e (f) 100 mol% de MT. 108
- Figura 58: Imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% mescladas com imagens de DIC de GUVs de POPC/DPPC 7:3 (a) sem MT e (b) com 10 mol% de MT. 109
- Figura 59: Reconstrução tridimensional de imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% de GUVs de POPC/DPPC 7:3 (a) sem MT, e com adição de (b) 5, (c) 10, (d) 20, (e) 50 e (f) 100 mol% de MT. 110
- Figura 60: Sequência de imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% mescladas com imagens de DIC de GUVs de POPC/DPPC 7:3 sem MT. Intervalo entre as imagens de 11,5 s. 110
- Figura 61: Sequência de imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% mescladas com imagens de DIC de GUVs de POPC/DPPC 7:3 com 5 mol% de MT. Intervalo entre as imagens de 65,8 s. 110
- Figura 62: Imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% mescladas com imagens de DIC de GUVs de POPC/DPPC/Col 1:1:1 (a) sem MT, (b) com 5 mol% e (c) com 10 mol% de MT. 111
- Figura 63: Reconstrução tridimensional de imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% de GUVs de POPC/DPPC/Col 1:1:1 a) sem MT, e com b) 5 e c) 10 mol% de MT. 111
- Figura 64: Reconstrução tridimensional de imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% de GUVs de POPC/DPPC/Col 1:1:1 (a) sem MT, e com adição de (b) 5, (c) 10, (d) 20, (e) 50 e (f) 100 mol% de MT. Os destaques mostram as GUVs que apresentam domínios. 112
- Figura 65: Reconstrução tridimensional de imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% de GUVs de DOPC/DPPC/Col 1:1:1 com (a) 5 e (b) 10 mol% de MT. 113

- Figura 66: Imagem de FLIM da sonda C12-NBD-PC 0,02 mol% em GUVs de POPC. Imagem de uma área (a) antes e (b) após a adição de 100 μ M de MT, (c) de uma segunda área já com 100 μ M de MT e (d) após a adição de mais 100 μ M de MT, e (e) uma terceira área já com os 200 μ M de MT. 114
- Figura 67: Imagem de FLIM da sonda C12-NBD-PC 0,01 mol% em GUVs de POPC, (a) antes e após a adição de (b) 50 e (c) 400 μ M de MT. 115
- Figura 68: Imagens de FLIM da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de POPC (a) sem MT e com (b) 5 e (c) 10 mol% de MT, com a região de interesse em evidência. 116
- Figura 69: Decaiemento da intensidade de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de POPC (*pontilhado*) e ajuste (*contínuo*) sem MT (*preto*), com 5 (*vermelho*) e 10 (*azul*) mol% de MT a partir da ROI das imagens de FLIM da Figura 68. 116
- Figura 70: Valores dos tempos de vida mais longos obtidos a partir do ajuste biexponencial dos decaimentos da Figura 69. 116
- Figura 71: Histogramas de tempo de vida de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de POPC sem MT (*preto*), com 5 (*vermelho*) e 10 (*azul*) mol% de MT a partir da ROI das imagens de FLIM da Figura 68. 117
- Figura 72: Imagens de FLIM da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de POPC/Col 7:3 (a) sem MT e com adição de (b) 5, (c) 10, (d) 20 e (e) 50 mol% de MT, com a região de interesse em evidência. 117
- Figura 73: (a) Valores dos tempos de vida mais longos obtidos a partir do ajuste biexponencial dos decaimentos da intensidade de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de POPC/Col 7:3 e (b) histogramas de distribuição dos tempos na ROI das imagens de FLIM da Figura 72, sem MT (*preto*), com 5 (*vermelho*), 10 (*azul*), 20 (*lilás*) e 50 (*verde*) mol% de MT. 118
- Figura 74: Imagens de FLIM da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de POPC/Cer/Col 1:1:1 (a) sem e com (b) 5 e (c) 10 mol% de MT, com a região de interesse em evidência. 119
- Figura 75: (a) Valores dos tempos de vida mais longos obtidos a partir do ajuste biexponencial dos decaimentos da intensidade de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de POPC/Cer/Col 1:1:1 e (b) histogramas de distribuição dos tempos na ROI das imagens de FLIM da Figura 74, sem MT (*preto*), com 5 (*vermelho*) e 10 (*azul*) mol% de MT. 119
- Figura 76: Imagens de FLIM da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de POPC/Cer/Col 1:1:1 (a) sem MT e com adição de (b) 5, (c) 10 e (d) 20 mol% de MT, com a região de interesse em evidência. 120
- Figura 77: (a) Valores dos tempos de vida mais longos obtidos a partir do ajuste biexponencial dos decaimentos da intensidade de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de POPC/Cer/Col 1:1:1 e (b) histogramas de distribuição dos tempos na ROI das imagens de FLIM da Figura 76, sem MT (*preto*), com 5 (*vermelho*), 10 (*azul*) e 20 (*lilás*) mol% de MT. 120
- Figura 78: Imagens de FLIM da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de POPC/Cer/Col 8:1:1 (a) sem e com (b) 5 e (c) 10 mol% de MT, com a região de interesse em evidência. 121

- Figura 79: (a) Valores dos tempos de vida mais longos obtidos a partir do ajuste biexponencial dos decaimentos da intensidade de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de POPC/Cer/Col 8:1:1 e (b) histogramas de distribuição dos tempos na ROI das imagens de FLIM da Figura 78, sem MT (*preto*), com 5 (*vermelho*) e 10 (*azul*) mol% de MT. 121
- Figura 80: Imagens de FLIM da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de POPC/Cer/Col 8:1:1 (a) sem MT e com adição de (b) 5, (c) 10 e (d) 20 mol% de MT, com a região de interesse em evidência. 121
- Figura 81: (a) Valores dos tempos de vida mais longos obtidos a partir do ajuste biexponencial dos decaimentos da intensidade de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de POPC/Cer/Col 8:1:1 e (b) histogramas de distribuição dos tempos na ROI das imagens de FLIM da Figura 80, sem MT (*preto*), com 5 (*vermelho*), 10 (*azul*) e 20 (*lilás*) mol% de MT. 122
- Figura 82: Imagens de FLIM da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de POPC/DPPC 7:3 (a) sem MT e (b) com 10 mol% de MT, com a região de interesse em evidência. 122
- Figura 83: Histogramas de distribuição dos tempos na ROI das imagens de FLIM da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de POPC/DPPC 7:3 da Figura 82, sem MT (*preto*), e com 10 mol% de MT (*azul*). 123
- Figura 84: Imagens de FLIM da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de POPC/DPPC/Col 1:1:1 (a) sem e com (b) 5 e (c) 10 mol% de MT, com a região de interesse em evidência. 123
- Figura 85: (a) Valores dos tempos de vida mais longos obtidos a partir do ajuste biexponencial dos decaimentos da intensidade de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de POPC/DPPC/Col 1:1:1 e (b) histogramas de distribuição dos tempos na ROI das imagens de FLIM da Figura 84, sem MT (*preto*), com 5 (*vermelho*) e 10 (*azul*) mol% de MT. 124
- Figura 86: Imagens de FLIM da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de POPC/DPPC/Col 1:1:1 com adição de (a) 5, (b) 10, (c) 20 e (d) 50 mol% de MT, com a região de interesse em evidência. 124
- Figura 87: (a) Valores dos tempos de vida mais longos obtidos a partir do ajuste biexponencial dos decaimentos da intensidade de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de POPC/DPPC/Col 1:1:1 e (b) histogramas de distribuição dos tempos na ROI das imagens de FLIM da Figura 86, sem MT (*preto*), com 5 (*vermelho*), 10 (*azul*), 20 (*lilás*) e 50 (*verde*) mol% de MT. 124
- Figura 88: Imagens de FLIM da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de POPC/DPPC/Col 1:1:1 (a) sem e com (b) 5 e (c) 10 mol% de MT, com a região de interesse em evidência. 125
- Figura 89: (a) Valores dos tempos de vida mais longos obtidos a partir do ajuste biexponencial dos decaimentos da intensidade de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de POPC/DPPC/Col 1:1:1 e (b) histogramas de distribuição dos tempos na ROI das imagens de FLIM da Figura 88, sem MT (*preto*), com 5 (*vermelho*) e 10 (*azul*) mol% de MT. 125

Figura 90: Imagens de FLIM da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de DOPC/DPPC/Col 1:1:1 com (a) 5 mol% e com adição de mais (b) 5 e mais (c) 10 mol% e com (d) 10 mol% de MT, com a região de interesse em evidência. 126

Figura 91: Histogramas de distribuição dos tempos na ROI das imagens de FLIM da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de DOPC/DPPC/Col 1:1:1 da Figura 90, com (a) 5 (*preto*), (b) 5 mais adição de 5 (*vermelho*) e (c) 5 mais adição de 15 (*azul*) mol% de MT. 126

Figura 92: Valores dos tempos de vida mais longos obtidos a partir do ajuste dos decaimentos da intensidade de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de DOPC/DPPC/Col 1:1:1 na ROI das imagens de FLIM da Figura 90. Símbolos completos com MT e abertos com MT adicionada. (a) ROI de toda a GUV, (b) ROI somente da fase líquido-ordenada e (c) ROI somente da fase líquido-desordenada. 127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados das medidas de DLS, feitas a temperatura ambiente, em LUVs de POPC (1 mM) com diferentes composições e com a presença das sondas fluorescentes NBD-lipídios. Os valores d são os diâmetros e p os índices de polidispersividade.	71
Tabela 2 - Efeitos das sondas de spin 5-doxy-PC ou 16-doxy-PC (2,5 mol%), e da droga MT (5 mol%) sobre os resultados das medidas de DLS, em LUVs de diferentes composições. r : raios e p : índices de polidispersividade, valor médio com respectivo desvio-padrão. Temperatura ambiente.	71
Tabela 3 – Parâmetros do ajuste biexponencial do decaimento da intensidade de fluorescência (tempo de vida τ_i , fator pré-exponencial normalizado α_i e tempo de vida médio τ_m) das sondas NBD-lipídios 5 μ M em LUVs de DMPC e DPPC 1 mM, em PBS, pH 7,4 sem MT e com 100 μ M de MT (10 mol%), nas fases gel (15 °C) e fluida (35 °C para o DMPC e 55 °C para DPPC). $\lambda_{exc} = 465$ nm, $\lambda_{em} = 530$ nm.	76
Tabela 4 - Parâmetros dos ajustes biexponenciais das curvas de decaimento da intensidade de fluorescência de LUVs de POPC e POPC/Col 5:1 marcadas com as sondas NBD-lipídios 0,5 mol%. τ_i são os tempos de vida de fluorescência com suas respectivas incertezas do ajuste, α_i são os fatores pré-exponenciais normalizados, e τ_m é o tempo de vida médio calculado a partir desses valores.	79
Tabela 5 – Valores de tempo de vida das sondas NBD-lipídios 0,5 mol% em sistema de LUVs de POPC/DPPC 1:1 e efeito da adição de MT em concentrações de 20 até 100 μ M.	80
Tabela 6 – Fluorescência destruída pelo ditionito de sódio após um tempo infinito (platô), $F(\infty)$, e a constante de taxa da reação de redução, k , para a sonda NBD-PE 0,5 mol% em LUVs de POPC, POPC/Col 9:1 e POPC/Cer/Col 8:1:1 na ausência (-) e na presença (+) de 5 mol% de MT.	82
Tabela 7 - Coeficientes de difusão D_i ($\mu\text{m}^2/\text{s}$) das sondas NBD-lipídios 0,5 mol%, em etanol e em LUVs (1 mM) de diversas composições a temperatura ambiente.	85
Tabela 8 - Coeficientes de difusão D_i ($\mu\text{m}^2/\text{s}$) das sondas NBD-PE, C6-NBD-PC e C12-NBD-PC 0,5 mol%, nas LUVs de POPC/DPPC 7:3 1 mM e efeito da adição de MT de 20 até 100 μ M.	86
Tabela 9 - Coeficientes de difusão D_i ($\mu\text{m}^2/\text{s}^{-1}$) da sonda C12-NBD-PC em LUVs de POPC/Col 5:1 1 mM, na ausência e na presença de MT até 50 μ M, com seus respectivos coeficientes ρ_i e a porcentagem relativa de cada coeficiente P_i . Foram realizados pelo menos dois experimentos e os valores são uma média com seu respectivo desvio-padrão. O valor de n é o número de medidas consideradas nas estatísticas.	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADC	<i>analog-to-digital converter</i> (conversor análogo digital)
ALP	<i>alkyl lysophospholipid</i> (alquil lisofosfolípido)
ATP	<i>adenosine triphosphate</i> (adenosina trifosfato)
5-doxyl-PC	1-palmitoyl-2-(5-doxylstearoyl)- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
C6-NBD-PC	1-palmitoyl-2-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl]- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
C12-NBD-PC	1-palmitoyl-2-[12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl]- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
16-doxyl-PC	1-palmitoyl-2-(16-doxylstearoyl)- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
CAH	constante de acoplamento hiperfino
Cer	ceramida
CMC	<i>critical micelle concentration</i> (concentração micelar crítica)
Col	colesterol
DIC	<i>differential interference contrast microscopy</i> (microscopia por contraste de interferência diferencial)
DiIC ₁₈	1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate
DLS	<i>dynamic light scattering</i> (espalhamento dinâmico de luz)
DMPC	1,2-dimiristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DPPC	1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DSC	<i>differential scanning calorimetry</i> (calorimetria diferencial de varredura)
ESR	<i>electron spin resonance</i> (ressonância de spin do elétron)
F	fluido
FCS	<i>fluorescence correlation spectroscopy</i> (espectroscopia de correlação de fluorescência)
FFCLRP	Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
FLCS	<i>fluorescence lifetime correlation spectroscopy</i> (espectroscopia de correlação de tempo de vida de fluorescência)
FLIM	<i>fluorescence lifetime imaging microscopy</i> (microscopia de imagem por tempo de vida de fluorescência)
G	gel
GUV	<i>giant unilamellar vesicle</i> (vesícula unilamelar gigante)
HBS	HEPES <i>buffered salt solution</i> (solução salina tamponada HEPES)
IPC	<i>inisol phosphorilceramide</i> (inositol fosforilceramida)

l_d	líquido-desordenada ou gel
l_o	líquido-ordenada ou <i>raft</i>
LSM	<i>laser scanning microscope</i> (microscópio com varredura de laser)
LUV	<i>large unilamellar vesicle</i> (vesícula unilamelar grande)
LV	leishmaniose visceral
MCA	<i>multichannel analyser</i> (analisador multicanal)
MCS	<i>multichannel scaler</i> (medidor multicanal)
MLV	<i>multilamellar vesicle</i> (vesícula multilamelar)
MT	miltefosina
MT-EtBDP	11-(4,4-difluoro-6-etil-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-2-il)n-undecil-fosfatidil-colina)
NBD	7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il
NBD-PE	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)
NTD	<i>neglected tropical diseases</i> (doenças tropicais negligenciadas)
PC	fosfatidilcolina
PCS	<i>photon correlation spectroscopy</i> (espectroscopia por correlação de fótons)
PE	fosfatidiletanolamina
PL	fosfolipídio
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
PS	fosfatidilserina
PSM	palmitoyl sphingomyelin
RET	<i>resonance energy transfer</i> (transferência de energia por ressonância)
ROI	<i>region of interest</i> (região de interesse)
S	surfactante
SL	esfingolipídio
SM	<i>sphingomyelin</i> (esfingomielina)
s_o	sólido-ordenada ou gel
SPAD	<i>single photon avalanche diode</i> (diodo de avalanche de fóton único)
SUV	<i>small unilamellar vesicle</i> (vesícula unilamelar pequena)
TAC	<i>time-to-amplitude converter</i> (conversor tempo-amplitude)
TCSPC	<i>time-correlated single photon counting</i> (contagem de fótons únicos correlacionados no tempo)
WHO	<i>world health organization</i> (organização mundial da saúde)

SUMÁRIO

Capítulo 1. Introdução.....	27
1.1. Sobre a leishmaniose.....	27
1.2. Tratamentos utilizados	28
1.3. A miltefosina.....	28
1.4. A membrana da Leishmania.....	31
1.5. Membranas modelo.....	33
1.5.1. Vesículas simples de fosfolípidios	34
1.5.2. Vesículas mistas	35
1.6. Objetivos gerais.....	37
Capítulo 2. Materiais e Métodos.....	39
2.1. Materiais.....	39
2.2. Preparação das membranas modelo	40
2.2.1. Vesículas unilamelares gigantes (GUVs).....	41
2.2.2. Vesículas unilamelares grandes (LUVs)	42
2.3. Técnicas de fluorescência.....	43
2.3.1. Sondas Fluorescentes.....	44
2.4. Espectroscopia de fluorescência.....	46
2.4.1. Espectroscopia de fluorescência de estado estacionário.....	46
2.4.2. Ensaio de ditionito.....	47
2.4.3. Espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo	49
2.4.4. Anisotropia de fluorescência	51
2.5. Microscopia óptica	51
2.5.1. Microscopia de contraste de fase.....	52
2.5.2. Microscopia de contraste por interferência diferencial	52
2.6. Microscopia de fluorescência.....	53
2.6.1. Microscopia confocal de fluorescência	53
2.6.2. Espectroscopia de correlação de fluorescência.....	55
2.6.3. Microscopia de imagem por tempo de vida de fluorescência.....	58
2.7. Técnicas complementares	61
2.7.1. Espalhamento dinâmico de luz.....	61
2.7.2. Calorimetria diferencial de varredura.....	62

2.7.3. Espectroscopia de ressonância de spin do elétron	63
2.8. Procedimentos experimentais.....	66
Capítulo 3. Resultados e Discussão	67
3.1. Interação da miltefosina com LUVs.....	67
3.1.1. Medidas de DSC e transições de fase em LUVs	69
3.1.2. Medidas de DLS	70
3.1.3. Medidas de ESR	72
3.1.4. Espectroscopia de fluorescência das LUVs.....	75
3.1.5. Ensaio de ditionito.....	81
3.1.6. Medidas de FCS	85
3.2. Interação do análogo fluorescente MT-EtBDP com LUVs.....	89
3.3. Caracterização de GUVs e interação com miltefosina	93
3.3.1. Microscopia de fluorescência e contraste de fase.....	94
3.3.2. Microscopia confocal de fluorescência	98
3.3.3. FLIM	114
Capítulo 4. Conclusões	128
Referências	132

Capítulo 1. Introdução

Neste trabalho apresentamos o estudo da interação da droga anti-*Leishmania* miltefosina com modelos de membrana lipídica com diferentes composições de até três lipídios, que se aproximam da composição lipídica real da membrana plasmática do parasita da *Leishmania*. Para isso, foram utilizadas como técnicas principais a espectroscopia e a microscopia de fluorescência e como técnicas complementares, espalhamento dinâmico de luz, calorimetria diferencial de varredura e ressonância paramagnética eletrônica.

1.1. Sobre a leishmaniose

A leishmaniose é um complexo de doenças que estão entre as Doenças Tropicais Negligenciadas (NTD, do inglês *Neglected Tropical Diseases*) (1) que tem sido foco da Organização Mundial da Saúde (em inglês *World Healthy Organization*, WHO) (2). A doença é causada por diferentes espécies do gênero *Leishmania*, um parasita protozoário intracelular que se aloja nas células de defesa do organismo.

Leishmania spp. são parasitas protozoários que necessitam essencialmente de dois hospedeiros obrigatórios diferentes para completar seu ciclo de vida biológico: um inseto vetor invertebrado, 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). Os parasitas *Leishmania* existem em duas formas que são morfológica e bioquimicamente diferentes. A forma nos insetos, chamada de promastigota, é dotada de mobilidade e tem um corpo fusiforme. As amastigotas, aflageladas, presentes no hospedeiro vertebrado, têm formato esférico (3).

A doença pode se manifestar de três diferentes formas clínicas: a leishmaniose visceral (LV), que é fatal se não tratada, a leishmaniose cutânea e a mucocutânea (4). A leishmaniose visceral tem uma incidência estimada de 300 mil casos por ano e 20 a 40 mil pessoas morrem anualmente por causa da doença (5). Ela atinge principalmente grupos da população mais pobre, que vivem em áreas rurais, e tem graves implicações como um problema de saúde pública (6). Ainda não há nenhuma vacina aprovada para uso clínico (4). Cerca de 90% do total de casos ocorrem em 5 países: Índia, Bangladesh, Brasil, Nepal e Sudão (2). A forma visceral da doença tem avançado sobre as cidades brasileiras nos últimos anos, atingindo

cerca de 3.100 pessoas por ano e matando em mais de 90% dos casos se não tratada de modo adequado (7).

1.2. Tratamentos utilizados

Os tratamentos da leishmaniose são feitos principalmente por quimioterapia, com antimônios pentavalentes ou sais de pentamidina como opção padrão de primeira linha. Esses fármacos requerem hospitalização do paciente, apresentam resposta clínica variável e efeitos colaterais importantes. Uma terapia alternativa é baseada na anfotericina B deoxicolato (AmB), um antibiótico antifúngico que é nefrotóxico e, portanto, é melhor administrado com uma formulação lipossomal. Na forma lipossomal a AmB é muito efetiva com quase nenhum efeito colateral, mas não é aplicável em áreas de alta incidência da doença devido ao preço e às limitações de estocagem. Os problemas acima, além da resistência ainda crescente contra os antimônios pentavalentes, dão origem a um consenso em relação à procura por tratamentos alternativos para a leishmaniose.

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.

1.3. A miltefosina

Os alquil-lisofosfolipídios (ALPs, do inglês *alkyl lysophospholipids*) são drogas anticâncer que agem no nível da membrana celular, mas não têm a mesma ou o citoesqueleto como alvo, e a acumulação intracelular da droga é pré-requisito para a sua atividade. Análogos de lisofosfolipídios têm sido empregados como fármacos para o tratamento das manifestações cutânea e visceral da *Leishmaniose*. A miltefosina (MT), hexadecilfosfocolina (Figura 1), é uma alquilfosfocolina sintética que apresenta propriedades antineoplásicas, induzindo a morte celular por apoptose da célula tumoral, e que também apresenta potente atividade leishmanicida (8) quando ministrada oralmente. A MT foi primeiramente registrada para a leishmaniose visceral em 2004 (9). Embora o mecanismo de ação antitumor da miltefosina tenha sido elucidado para as células de mamíferos, sua citotoxicidade não foi determinada em *Leishmania sp.* (10), mas sabe-se que causa morte por apoptose em *L. donovani* (11). Vários estudos experimentais *in vitro* e *in vivo* mostraram que a MT é

citotóxica para ambos os estágios, promastigota e amastigota, de várias espécies de *Leishmania*. Em contraste ao tratamento padrão, os antimônios pentavalentes, por exemplo, a miltefosina funciona independentemente do sistema imune, principalmente através de toxicidade direta contra o parasita de *Leishmania* (12).

Figura 1: Molécula da miltefosina, hexadecilfosfocolina.

Embora o mecanismo da ação antiprotozoário da MT seja pouco entendido, várias hipóteses foram formuladas como, por exemplo, a de dano à membrana. A MT se acumula na membrana plasmática, devido às suas propriedades anfifílicas, portanto afetando a fluidez da membrana (13). A atividade da MT é devida à sua acumulação intracelular, regulada por transportadores do fármaco (14). Portanto, supõe-se que o fármaco interaja com a membrana celular do parasita por modulação da superfície celular e ativação de fosfolipases (15). O conhecimento do mecanismo de morte mediada pela miltefosina facilitará o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra os parasitas de *Leishmania* (10).

A internalização da droga depende da correlação entre a entrada e os níveis de sensibilidade da célula alvo, sendo a susceptibilidade ao fármaco diretamente dependente da habilidade de internalização. Esse processo depende dos níveis de expressão das proteínas responsáveis pela entrada da MT: LdMT (α), membro da subfamília da P4-ATPase, e LdRos3, subunidade β da LdMT (16). Quando a LdMT está superexpressa há 20 vezes mais droga internalizada e 10 vezes mais susceptibilidade em promastigotas.

A MT interage com os lipídios da célula em vários níveis e sua ação envolve a interação com lipídios, em particular, lipídios de membrana – fosfolipídios e esteróis. Estudos de interações da MT com esses lipídios em sistemas modelo sugerem afinidade da MT com *rafts* lipídicos ricos em colesterol (17). O *uptake* da MT por células cancerígenas, por exemplo, começa pela inserção na membrana plasmática seguida pela internalização. Dentro da célula, a droga interfere com enzimas envolvidas no metabolismo lipídico, podendo induzir apoptose. Efeitos no metabolismo lipídico também foram observados em parasitas de *Leishmania*. Nesses parasitas, o *uptake* ocorreria da seguinte maneira: a MT se insere na camada externa da membrana plasmática na forma monomérica quando sua concentração está abaixo da concentração micelar crítica (CMC) da droga (50 μ M) e como ambos, monômeros

e oligômeros, quando está acima da CMC, de. Então uma translocase aminofosfolípido de duas subunidades, LdMT-LdRos3, internaliza a droga.

É sugerido que em células de linfoma de rato e carcinoma humano, mas também em outras linhas celulares de mamíferos, o fármaco é internalizado por endocitose mediada por *raft*. Em parasitas de *Leishmania* ocorrem 3 fases de acumulação: 1. Ligação do fármaco à monocamada externa da membrana plasmática; 2. Internalização do fármaco na célula por *flip-flop* (18) por dois caminhos: i. endocítico: quando a quantidade de fármaco ligada à membrana é extremamente alta; ii. Atividade da flipase ou não-endocítico: proteínas específicas (mecanismo dependente de ATP) por transportadores de MT, LdMT e a subunidade beta LdRos3; iii. Alvos intracelulares e metabolismo: quando na monocamada interna da membrana, os monômeros se desligam e se ligam às membranas das organelas internas, rompendo-as (por efeito detergente, já que a concentração intracelular é bem maior que a concentração extracelular). Apesar da alta capacidade de internalização do fármaco, o metabolismo da MT dentro da célula é bem lento. Altas concentrações intracelulares de MT são responsáveis pela morte do parasita. Ao mesmo tempo, o efluxo de MT reduz a acumulação intracelular do fármaco. Dentro da *Leishmania*, os mecanismos são específicos: interferência no metabolismo lipídico, por enzimas da membrana do retículo endoplasmático por inibição do caminho de síntese de fosfatidilcolina (PC). Como a *Leishmania* é um parasita intracelular obrigatório dos macrófagos, a MT precisa atravessar várias barreiras de membrana.

A atividade depende do tipo da célula e da taxa de *uptake* dentro da célula (apoptose induzida por ALP). O *uptake* é um pré-requisito para atingir como alvo os eventos intracelulares que resultam na morte celular. Quando a concentração intracelular de ALP está acima de um limiar, ocorre a indução de apoptose. A MT produz defeitos numerosos e diferentes na célula, por atividade detergente, rompendo as membranas intracelulares, levando à morte celular por apoptose.

O que se conhece do mecanismo de ação da miltefosina contra a *Leishmania* é que há interferência com lipídio (PC), alteração da atividade da fosfolipase C, A2 ou D, eventos de transdução do sinal dos lipídios, inibição da atividade da oxidase citocromo c, despolarização mitocondrial e finalmente morte celular por apoptose (16).

1.4. A membrana da *Leishmania*

A membrana plasmática é a via por onde os fármacos entram na célula, e qualquer modificação significativa na sua composição pode ter um impacto nas interações fármaco-membrana. Para a compreensão dos mecanismos de ação de fármacos que possuem afinidade por membranas celulares, é importante o conhecimento da composição das membranas. Os fosfolipídios (PLs) são os componentes majoritários das membranas biológicas, e os esfingolipídios (SLs) são outro grande grupo de componentes de membrana dos eucariotos. Além de cumprir importante papel estrutural, os fosfolipídios cumprem funções relevantes no metabolismo de diversas células, em processos de reconhecimento de moléculas sinalizadoras, transporte através de membranas, reorganização do citoesqueleto, etc. (19, 20). Já os esfingolipídios revelam-se componentes ativos em membranas celulares, envolvendo-se em processos de sinalização, incluindo apoptose, reconhecimento celular, crescimento e diferenciação (21, 22).

Mas PLs e SLs, também abundantes na membrana de *Leishmania*, estão presentes com composição, metabolismo e função diferentes das células de mamíferos (Figura 2), e a fisiologia da membrana, assim como os aspectos funcionais no parasita, podem estar relacionados a propriedades estruturais resultantes da composição peculiar de sua membrana (23). Os PLs são 70% do total de lipídios em *Leishmania* e, dentre esses, de 30 a 40% com o grupo da cabeça polar PC, 10% PE (fosfatidiletanolamina) e 10% PS (fosfatidilserina). As cadeias de ácidos graxos são, em sua maioria, de 18 carbonos ou mais, e a proporção varia de acordo com a espécie de *Leishmania* (24). Sobre os SLs, ao contrário dos mamíferos ou plantas, os parasitas de *Leishmania* não sintetizam esfingomielina, e a maioria dos compostos SLs são a fosforilceramida inositol não-glicolisada e ceramida, consistindo de esfingosina d18:1 e ácidos graxos C24:1 e C16:0. Dentre os esteróis, o ergosterol é dominante na membrana de *Leishmania* (23).

Figura 2: Distribuição dos lipídios da membrana plasmática de promastigotos da *L. major* de acordo com o grupo cabeça polar dos PLs. Adaptado de: (25).

Sabe-se que as membranas biológicas são compostas de domínios mais condensados (ordenados) e dinâmicos, os *rafts*, incluídos em uma fase fluida. A diferença é devida à saturação das cadeias hidrocarbônicas dos lipídios do *raft* (26), além da presença de SLs e colesterol. Como em outros organismos, os SLs e esteróis da *Leishmania* estão enriquecidos em microdomínios organizados da membrana, e os ester PLs tais como diacil PC são normalmente encontrados em uma fase mais fluida e desordenada, devido às suas cadeias de ácido graxo insaturadas e baixa temperatura de fusão (27). Essa composição lipídica única pode tornar os parasitas de *Leishmania* mais resistentes à perturbação lipídica que são geralmente fatais para outros organismos (23). É importante notar que o comportamento de drogas como a miltefosina difere na presença de PLs fluidos e condensados.

A MT se insere na membrana por miscibilidade e interage com os esteróis (28). Os esteróis nos *rafts* lipídicos agem como um reservatório de MT que fornecem o fármaco ao seu transportador (29). Os promastigotos resistentes à MT apresentam modificações na composição lipídica da membrana. Como a fluidez e a permeabilidade da membrana são influenciadas pela composição lipídica, membranas com diferentes composições lipídicas afetam a interação fármaco-membrana (16). Hipóteses sobre a ação da miltefosina em *Leishmania* sugerem a perturbação no metabolismo dos lipídios, principalmente os PLs, provocando uma diminuição na proporção de PCs e uma superexpressão dos PEs (30). Como os PLs são os principais componentes da membrana, essa variação de composição pode afetar as propriedades físicas e químicas da bicamada da membrana.

O entendimento das vias metabólicas dos diferentes tipos de lipídios de *Leishmania* pode contribuir para o desenvolvimento de moléculas que apresentem atividade anti-parasita. Por outro lado, as propriedades estruturais da bicamada lipídica podem exercer importante papel modulador na atividade biológica dos diferentes componentes presentes na membrana como, por exemplo, a presença de esfingolipídios, que pode levar à existência de microdomínios, que apresentam grau de ordem estrutural diversa de regiões de maior fluidez contendo apenas fosfolipídios.

A composição bioquímica da membrana do parasita *Leishmania* afeta a atividade da miltefosina (16) e efeitos no metabolismo lipídico promovidos pela droga têm sido observados em parasitas *Leishmania*. A miltefosina, em concentrações de até 10 mol%, desordena levemente membranas modelo com *rafts* compostas de POPC/PSM/Col (fosfolipídio insaturado, esfingomielina e colesterol) somente com composições a partir de 40 mol% de colesterol, preservando a distribuição de tamanhos dos domínios (31).

Dentro dessa perspectiva, é importante investigar a dinâmica estrutural de membranas modelo, influenciada pela ação de compostos anti-*Leishmania*. Para tanto, é fundamental estudar propriedades estruturais de sistemas mistos compostos de misturas de PLs e SLs, e a maneira pela qual essas propriedades são afetadas pela presença de fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose.

1.5. Membranas modelo

A membrana plasmática é responsável pela separação do conteúdo de cada uma das células do seu ambiente. Ela serve de barreira, prevenindo a mistura do conteúdo da célula com o seu ambiente externo, e ao mesmo tempo permite a passagem seletiva de metabólitos para dentro e para fora da célula. Os principais constituintes dessas membranas são os lipídios e proteínas. Há também uma pequena quantidade de carboidratos, mas na forma combinada de glicolipídios ou glicoproteínas (32).

A complexidade das membranas biológicas em termos de sua composição lipídica, proteica e glicoproteica, e a natureza múltipla de suas funções leva ao desejo natural de separação de seus diversos componentes para que possam ser estudados em sistemas mais simples e, se possível, isoladamente. Há processos que dependem de eventos sequenciais que envolvem vários componentes da membrana, mas aprendendo sobre componentes individuais é possível fazer deduções razoáveis sobre essa sequência de eventos que ocorre *in vivo* (33). A maior parte dos lipídios de membrana consiste em fosfolipídios, esfingolipídios e glicolipídios, que são moléculas anfifílicas com duas cadeias hidrocarbônicas. Os grupos de cabeça polar hidrofílica variam bastante entre as diferentes membranas, mas as cadeias hidrocarbônicas são semelhantes, sempre longas e saturadas ou insaturadas. Nas membranas de bactéria os lipídios são exclusivamente de duas cadeias, enquanto as membranas de organismos superiores podem ainda conter até 25% de colesterol (32).

Há diversos tipos de sistemas modelo que podem ser utilizados, dentre eles: 1) lipossomos (vesículas); 2) bicamadas lipídicas planares; e 3) vesículas preparadas por fusão de lipossomos com vesículas isoladas de biomembranas de origem celular (33). Nesse trabalho são utilizados o primeiro tipo.

Vesículas aquosas são observadas com surfactantes de duas cadeias que tenham cadeias alquila com 10 ou mais átomos de carbono. As vesículas são objetos dinâmicos, que trocam surfactantes ou fosfolipídios com a solução ao redor. Essas trocas são bem mais lentas que em micelas, já que os fosfolipídios que formam as vesículas são muito mais hidrofóbicos,

sendo esse efeito praticamente desprezível. Diferentes métodos são usados para preparar as vesículas (34).

É possível estudar esses modelos de membrana utilizando espectroscopia de fluorescência com vesículas pequenas ou grandes (SUVs, *small unilamellar vesicles*, LUVs, *large unilamellar vesicles* e MLVs, *multilamellar vesicles*) (35, 36). As LUVs têm tamanho da ordem de 100 a 200 nm, assim como vesículas intracelulares, e podem ser utilizadas para estudo de efeitos de perturbação de certos lipídios por espectroscopia de fluorescência ou espectroscopia de ressonância de spin do elétron.

Já medidas de microscopia de fluorescência são feitas principalmente utilizando GUVs (*giant unilamellar vesicles*) (37-39). As GUVs apresentam diâmetros de até dezenas de μm e são facilmente visualizadas por microscopia óptica e podem apresentar domínios segregados lateralmente de misturas lipídicas. Nas GUVs é possível a visualização de domínios por compostos fluorescentes, assim como a determinação de coeficiente de partição ou de propriedades físicas, como tempo de vida ou anisotropia de fluorescência, dependentes dos diferentes domínios (40).

Ambos os modelos de membrana utilizados, LUVs e GUVs, representam a bicamada lipídica, permitindo que essa estrutura seja observada por diferentes técnicas, assim como as alterações provocadas nela pela interação com a miltefosina.

1.5.1. Vesículas simples de fosfolipídios

Os fosfolipídios com duas cadeias acila apresentam estrutura de bicamadas em meio aquoso. Dentre os fosfolipídios de membrana, o grupo da cabeça polar pode apresentar diferentes cargas, podendo, em pH neutro, ser aniônicos como o ácido fosfatídico, o fosfatidilglicerol, o fosfatidilinositol e a fosfatidilserina, ou zwitteriônicos como a fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina. O estado de carga da cabeça polar é importante quando se deseja estudar efeitos elétricos na interação de moléculas com a membrana (41). Os FLs também podem variar de acordo com as cadeias hidrocarbônicas, que podem ser saturadas ou insaturadas e com diferentes comprimentos.

O comportamento das bicamadas formadas por um único fosfolipídio em função da temperatura é descrito em termos de fases termotrópicas que podem ser separadas como reflexos da estrutura dentro das bicamadas e da dinâmica da membrana. São elas a fase fluida (L_α), a fase gel (P_β) e a fase *ripple* L_β . Os contornos das vesículas são tipicamente de

bicamadas flexíveis (fluidas) e rígidas (gel ou sólidas) (42). Por exemplo, a transição principal do DPPC ($P_{\beta'} - L_{\alpha}$) é a 41°C correspondendo principalmente à fusão das cadeias hidrocarbônicas e a uma temperatura mais baixa ($T_p = 35^\circ\text{C}$), ocorre a comumente chamada pré-transição ($L_{\beta'} - P_{\beta'}$), onde as bicamadas planares rígidas se tornam onduladas (43). As vesículas lipídicas unilamelares no estado fluido são as mais importantes no entendimento de processos biológicos e também para aplicações técnicas (42).

A temperatura de transição das bicamadas fosfolipídicas aumenta com o comprimento da cadeia hidrocarbônica dos PLs, assim como com o grau de saturação dos seus ácidos graxos. Assim, as temperaturas de transição dos fosfolipídios DMPC (duas cadeias saturadas de 14 carbonos), DPPC (duas cadeias saturadas de 16 carbonos) e POPC (uma cadeia saturada de 16 carbonos e uma insaturação na segunda cadeia com 18 carbonos) são iguais a, respectivamente, $23,6^\circ\text{C} \pm 1,5^\circ\text{C}$; $41,3^\circ\text{C} \pm 1,8^\circ\text{C}$ e $-2,5^\circ\text{C} \pm 2,4^\circ\text{C}$ (44). Para experimentos sem controle de temperatura o uso do fosfolipídio POPC é mais adequado já que se sabe que a temperatura ambiente sua suspensão de vesículas estará na fase fluida.

1.5.2. Vesículas mistas

A separação de fases em vesículas compostas por misturas de lipídios produz uma ampla variedade de formatos de domínios lipídicos (45). Dependendo da composição e da temperatura da membrana, supõe-se a existência de pelo menos três diferentes fases lipídicas em membranas modelo: a fase líquido-ordenada (l_o), a fase líquido-desordenada (l_d), e a fase sólido-ordenada (s_o) ou fase gel (46). Bicamadas formadas por um único tipo de fosfolipídio apresentam uma única fase, s_o ou l_d , se a temperatura está abaixo ou acima da temperatura de transição de fase do lipídio (T_m), respectivamente. Já bicamadas com coexistência de lipídios de alta e baixa temperatura de transição de fase exibem coexistência dessas fases. Esteróis, em particular o colesterol, são necessários para formação da fase l_o (47). O formato do domínio lipídico está correlacionado com suas propriedades físicas, por exemplo, domínios circulares são normalmente atribuídos à fase l_o , e domínios dendríticos à fase gel (48).

A inserção de colesterol nas bicamadas lipídicas diminui a fluidez da membrana que se encontra na fase fluida, já que o seu sistema de anéis esteroides rígidos interfere na movimentação das cadeias laterais dos ácidos graxos dos outros lipídios da membrana. Esse componente lipídico de membranas também aumenta a faixa de temperatura de transição, inibindo a cristalização das cadeias laterais dos ácidos graxos ao se inserir entre elas,

fluidificando a membrana que se encontra na fase gel. As moléculas de colesterol se orientam na bicamada lipídica com os grupos hidroxila próximos aos grupos da cabeça polar das moléculas de fosfolipídios, e os rígidos anéis planos de esteroide interagem e parcialmente imobilizam as regiões das cadeia de hidrocarbonetos que são mais próximas aos grupos da cabeça polar. O colesterol tende a tornar as bicamadas lipídicas na fase fluida menos fluidas, mas também impede, em altas concentrações, que as cadeias de hidrocarbonetos, em membranas na fase gel, se aproximem e cristalizem, inibindo possíveis transições de fase (Figura 3) (49).

Figura 3: Esquema ilustrando as fases lipídicas de uma membrana modelo fosfolipídica e a influência da inserção do colesterol. Adaptado de: (49).

A molécula de colesterol apresenta caráter anfifílico, devido à presença de um único grupo OH, apresentando baixa afinidade pela água comparada aos grupos da cabeça altamente hidrofílicos dos outros lipídios da membrana. A variação da cabeça polar tem um efeito menor nas propriedades da bicamada que as cadeias hidrofóbicas, porém quando o colesterol é adicionado, ele é imediatamente incorporado na bicamada fosfolipídica, provocando efeitos na fluidez local. A natureza das cadeias hidrocarbônicas é importante, pois, se são todas saturadas, as bicamadas formadas apresentam um interior hidrofóbico ordenado, enquanto cadeias saturadas e insaturadas formam bicamadas com o interior hidrofóbico já líquido em temperaturas baixas normalmente abaixo da temperatura ambiente. O efeito de diferentes

proporções de colesterol é muito estudado (50-53), já que os *rafts*, que são domínios lipídicos mais ordenados, são formados na presença desse esterol.

Por sua vez, entre os esfingolipídios, o lipídio mais estudado é a esfingomielina (SM), presente nas membranas de mamíferos, seguido da ceramida, componente importante na membrana da *Leishmania*. Os SLs influenciam fortemente tanto a organização estrutural quanto as propriedades dinâmicas da membrana celular (54). Devido à sua alta hidrofobicidade e alta temperatura de fusão, tem a tendência de segregar dos outros lipídios, formando microdomínios ricos em ceramida, altamente ordenados (55). Áreas enriquecidas de ceramida são correspondentes a domínios do tipo *raft*, e então estão arranjadas de uma maneira mais estruturada. As propriedades estruturais da bicamada lipídica podem exercer um papel de modulação importante na atividade biológica de cada componente presente na membrana.

1.6. Objetivos gerais

Como descrito, a *Leishmaniose* é um problema de saúde pública mundial, e tem grande importância no Brasil, onde começa a atingir as grandes cidades com um maior número de pessoas com risco de infecção.

A droga miltefosina é uma alternativa aos tratamentos hoje utilizados no Brasil, que além de potente atividade leishmanicida, pode ser administrada oralmente, evitando hospitalização e permitindo seu uso em áreas endêmicas. Seu modo de ação é pouco conhecido, mas sabe-se que a interação do fármaco com a membrana do parasita é essencial, seja para sua incorporação à célula, ou alteração nas propriedades da membrana. A membrana da *Leishmania* apresenta algumas propriedades distintas das membranas de mamíferos, e elas podem ser responsáveis pela ação da MT nesses parasitas.

Neste trabalho apresentamos resultados de estudos sobre a interação da miltefosina com modelos de membrana com composição lipídica semelhante à membrana da *Leishmania*. Como membranas modelo foram utilizadas vesículas unilamelares, grandes e gigantes (*large* e *giant unilamellar vesicles*, LUVs e GUVs, respectivamente). Os experimentos foram baseados principalmente nas técnicas de fluorescência, tanto espectroscópicas quanto de microscopia, seja no estado-estacionário como resolvida no tempo. Utilizamos também, como técnicas complementares, o espalhamento dinâmico de luz, a calorimetria diferencial de varredura e a ressonância paramagnética eletrônica.

No próximo capítulo apresentamos Materiais e Métodos, onde são explicitadas as técnicas utilizadas. Dedicamos maior atenção a técnicas avançadas de FCS (do inglês *Fluorescence Correlation Spectroscopy*) e FLIM (do inglês *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*), uma vez que as técnicas espectroscópicas convencionais são descritas amplamente na literatura.

Capítulo 2. Materiais e Métodos

Neste capítulo são descritos os aspectos teóricos necessários para a descrição e análise das técnicas experimentais assim como os procedimentos experimentais, com os materiais utilizados e as técnicas experimentais empregadas para obtenção dos resultados do trabalho.

Os estudos experimentais desenvolvidos no projeto têm como técnicas principais a espectroscopia e a microscopia de fluorescência, tanto de estado estacionário como resolvida no tempo. Os sistemas estudados são agregados anfífilos em meio aquoso, mais especificamente vesículas lipídicas unilamelares, grandes ou gigantes (LUVs e GUVs, respectivamente, *large* e *giant unilamellar vesicles*), em interação com a MT.

2.1. Materiais

Os lipídios POPC, DPPC, colesterol e ceramida e as sondas fluorescentes NBD-PE, C6- e C12-NBD-PC, assim como as sondas de spin 5-doxyl-PC e 16-doxyl-PC, foram adquiridos no mercado da *Avanti Polar Lipids* (USA). A sonda DiIC₁₈ foi adquirida comercialmente da *Molecular Probes*. O fármaco miltefosina foi adquirido da *Sigma Aldrich*. Todos os compostos foram utilizados sem purificação posterior.

Tris e Triton X-100 são da Fluka (Seelze, Alemanha). A solução tampão HBS (HEPES *buffered salt solution*) contém HEPES (10 mM) e NaCl (150 mM) (pH 7,4), e HBS50, HEPES (50 mM) e NaCl (100 mM) (pH 7,4).

O sal ditionioto de sódio foi adquirido da Sigma (Deisenhofen, Alemanha). A solução estoque (1 M) foi preparada em tampão Tris 100 mM (pH 10,0), e armazenada em gelo e usada num intervalo de até 3 h após a preparação.

Quando não especificado, o meio aquoso utilizado foi o tampão fosfato 10 mM com pH 7,4. Esse tipo de tampão, concentração e pH foram utilizados para se aproximar às condições fisiológicas.

As medidas foram realizadas em geral em temperatura ambiente (~25°C). Medidas com controle de temperatura foram feitas utilizando banho térmico.

2.2. Preparação das membranas modelo

Foram feitos estudos de efeitos da miltefosina sobre propriedades estruturais de vesículas mistas compostas de misturas de PLs, SLs, e colesterol. Os fosfolipídios podem diferir na cabeça polar (aqui utilizamos somente a fosfocolina, PC, zwitteriônica, pois não era de interesse estudar o efeito da carga na interação já que a molécula de MT é também zwitteriônica, tendo carga líquida neutra), ou na dupla cauda lipídica (saturadas ou insaturadas, de diferentes comprimentos). Por outro lado, os SLs podem ser das classes das ceramidas e inositol fosforilceramida (IPC), mas aqui utilizamos a C16 ceramida, com 16 carbonos em uma das cadeias e 18 na outra que contém uma insaturação. As vesículas podem ser constituídas de dois tipos de PLs, PL/SL, SL/colesterol, e PL/SL/colesterol, sendo preparadas pelo método de extrusão (formando LUVs) e por eletroformação (originando GUVs). Os lipídios utilizados (DPPC, POPC, colesterol e C16 ceramida), estão apresentados na Figura 4.

Figura 4: Molécula dos fosfolipídios (a) DPPC (16:0 PC ou 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine), (b) POPC (16:0-18:1 PC ou 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine), (c) colesterol (de lã ovina > 98%), (d) ceramida (C16 ceramida ou N-palmitoyl-D-*erythro*-sphingosine).

Para a preparação das membranas na presença da MT é importante conhecer a concentração do fármaco nas células quando ele é aplicado. As concentrações no plasma sanguíneo vão de dezenas de nM a centenas de μ M (56). Foram realizados estudos com

diversas concentrações do fármaco em células de *Leishmania* de diferentes espécies em ambos os estágios, amastigota e promastigota, e os intervalos utilizados são da ordem de poucos a dezenas de μM , e nesse intervalo de concentrações ocorrem os efeitos de morte celular provocada pela miltefosina (12, 16, 57-64).

Considerando a quantidade de lipídios extraídos da membrana plasmática em uma determinada quantidade de células de *Leishmania* (65), e a concentração de células utilizada em experimentos com a MT, chega-se a uma concentração de lipídios da membrana plasmática de aproximadamente 1,5 mM. Nesses experimentos são utilizados de décimos a dezenas de μM de MT, levando a uma razão MT/lipídio de 0,01 a 10 mol%. Os experimentos foram conduzidos utilizando concentrações nesse intervalo, e algumas vezes maiores para observar os efeitos em função da concentração.

2.2.1. Vesículas unilamelares gigantes (GUVs)

As GUVs (*giant unilamellar vesicles*), com diâmetros da ordem de 10 μm , foram obtidas pelo método de eletroformação (66). Uma alíquota de 8 μL de solução estoque de 2,5 mM de lipídio com 0,001 a 1 mol% de sondas fluorescentes em clorofórmio é seca em duas lâminas de vidro cobertas com ITO. Um espaçador de Teflon é utilizado entre as duas lâminas com os filmes secos, e a câmara do espaçador é preenchida com solução de sacarose a 0,2 M em temperatura ambiente. Então é aplicada uma voltagem alternada com amplitude de 1,0 V e frequência de 10 Hz por 1 hora. Essa suspensão é então retirada da câmara, e uma alíquota de 10 μL é diluída em 2 mL de solução de glicose também a 0,2 M.

O contraste dado pela diferença entre a solução interna (glicose) e externa (sacarose) das vesículas é utilizado para obter as imagens por contraste de fase. Quando a bicamada lipídica sofre dano, ou seja, apresenta poros, essas soluções se misturam fazendo com que o contraste seja perdido. Essa técnica é útil para observar se há danos ocorrendo na membrana. Utilizando imagens de fluorescência, com o contraste dado pela sonda fluorescente adicionada no preparo das GUVs, é possível detalhar melhor o tipo de dano que está sendo causado à membrana.

Também preparamos GUVs adicionando alíquotas adequadas de cada solução estoque de lipídio em clorofórmio misturadas para obter uma concentração total de lipídios de 100 nM em 30 μL de clorofórmio. Cada solução é espalhada em um par de placas de titânio em uma placa de aquecimento a 50°C para facilitar a evaporação do solvente, e as placas são unidas

com *Parafilm* com um isolante entre elas. Os traços de clorofórmio são eliminados com as placas por 45 min à 1 h em alto vácuo. A câmara entre as placas é então preenchida com 1 mL de solução tampão de sacarose (250 mM sacarose, 15 mM NaN₃, osmolaridade de 280 mOsm/kg) pré-aquecida (55°C) e fechada. Então, um campo elétrico alternado de 10 Hz aumentando de 0,02 V a 1,3 V nos primeiros 30 min é aplicado por 2,5 h à 3,5 h à 55°C seguido por 45 min de 4 Hz e 1,3 V para destacar as GUVs formadas. As vesículas são armazenadas no escuro a temperatura ambiente e utilizadas em até 4 dias. Para as medidas as GUVs são adicionadas em solução tampão de glicose (250 mM glicose, 5,8 mM KH₂PO₄, 5,8 mM K₂HPO₄, pH 7,2, osmolaridade de 299 mOsm/kg) à uma razão de 1:1 em volume.

As GUVs foram preparadas com 0,1 mol% da sonda C6-NBD-PC e as seguintes composições POPC, POPC/Col 7:3, POPC/DPPC 7:3, POPC/Col/Cer 1:1:8, 1:1:1, 8:1:1, POPC/DPPC/Col 1:1:1 e DOPC/DPPC/Col 1:1:1. Três amostras de cada foram preparadas para cada experimento, uma sem MT, uma com 5 e outra com 10 mol% de MT. A amostra sem MT foi utilizada para adição posterior do fármaco diluído no tampão de glicose para adicionar apenas 1 µL no volume de 50 µL da amostra no microscópio. Essas amostras foram utilizadas para microscopia confocal.

2.2.2. Vesículas unilamelares grandes (LUVs)

As LUVs (*large unilamellar vesicles*), com diâmetros da ordem de 100 nm, foram obtidas pelo método de extrusão. Alíquotas da solução estoque foram calculadas de acordo com a concentração final de lipídio desejada, nesse caso de 1 mM, com a porcentagem de sonda variando entre 0,001 e 1 mol%. Essas alíquotas foram adicionadas em um tubo de ensaio em 400 µL de clorofórmio e secas em um agitador de tubos com fluxo de N₂. Após a secagem, o filme foi colocado em vácuo por 5 horas para remover os traços de solvente orgânico. As amostras foram então hidratadas com tampão fosfato 10 mM pH 7,4 acima da temperatura de transição dos lipídios contidos na amostra e agitadas.

A suspensão lipídica, que resulta em vesículas multilamelares, é então extrusada, ou seja, colocada em uma seringa, e atravessa um sistema com uma membrana de policarbonato com poros de diâmetro determinado, nesse caso de 0,1 µm, para obter vesículas unilamelares com diâmetro determinado. Esse processo de passagem através da membrana deve ser repetido um número ímpar de vezes de no mínimo 11 vezes e acima da temperatura de transição dos lipídios. Nesse trabalho a extrusão foi feita com 15 passagens através da

membrana. Medidas de DLS são feitas para controle do tamanho das vesículas formadas, que estão entre 100 e 140 nm, dependendo dos lipídios utilizados.

Para as medidas de ESR e ensaio de ditionito, foi utilizado o método de aquecimento/congelamento antes da extrusão da suspensão. Os lipídios em clorofórmio são secos em fluxo de N₂ no fundo de tubos de ensaio, onde é adicionado o tampão apropriado para cada experimento já aquecido, e a suspensão é então agitada em vórtice e colocada em banho térmico até 60°C. Foram realizados seis ciclos de três minutos de aquecimento e 10 minutos de congelamento, para que as vesículas multilamelares fossem se tornando unilamelares. Então a suspensão é extrusada, para que as LUVs tenham todas tamanho em torno de 100 nm, determinado pelo diâmetro da membrana de policarbonato utilizada no processo de extrusão.

2.3. Técnicas de fluorescência

A escolha de metodologias baseadas nas espectroscopias de fluorescência de estado estacionário e com resolução temporal é devida à experiência prévia nessas técnicas (67-72) e pelo conhecimento acumulado no grupo (73-75). Para a execução dos experimentos são utilizados lipídios marcados com sondas fluorescentes como 7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il (NBD) ligado a fosfatidiletanolamina (NBD-PE) ou a fosfatidilcolina nas posições 6 ou 12 da cadeia alifática (C6-NBD-PC e C12-NBD-PC, respectivamente), ou DiIC₁₈.

Os derivados fluorescentes inseridos nas membranas foram escolhidos convenientemente para execução de experimentos de espectroscopia e microscopia de fluorescência, com medidas de espectros, tempos de vida e anisotropia, além de espectroscopia de correlação de fluorescência e imagens de tempo de vida.

Usamos espectrofotômetro *Amersham Ultrospec 2100* para medidas de absorção óptica e medidas de fluorescência estática foram feitas em espectrofluorímetro *Hitachi F7000*, do Laboratório de Fotobiofísica do Departamento de Física da FFCLRP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

2.3.1. Sondas Fluorescentes

NBD-lipídios

Para os experimentos realizados foram utilizados os FLs marcados com NBD, os NBD-lipídios: NBD-PE, C6-NBD-PC e C12-NBD-PC, apresentados na Figura 5.

Figura 5: Molécula dos fosfolipídios marcados com a sonda fluorescente NBD (a) NBD-PE (16:0 NBD-PE ou 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl) (sal de amônia)), (b) C6-NBD-PC (16:0-6:0 NBD-PC ou 1-palmitoyl-2-[6-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl]-sn-glycero-3-phosphocholine) e (c) C12-NBD-PC (16:0-12:0 NBD-PC ou 1-palmitoyl-2-[12-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]dodecanoyl]-sn-glycero-3-phosphocholine).

Os espectros de absorção e emissão apresentam picos em 460 nm e 535 nm, respectivamente.

Simulações de dinâmica molecular de bicamadas lipídicas fluidas de DPPC puro e com análogos fluorescentes de NBD marcados na cadeia acila (C6-NBD-PC e C12-NBD-PC), mostram que o coeficiente de difusão dos análogos tem valor da ordem de $10 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ (76). A transição de fase da bicamada de DPPC é bastante alterada pela adição dos análogos fluorescentes no sistema, assim como os coeficientes de difusão das moléculas do lipídio DPPC para concentrações da sonda na proporção de 1,6 e 6,2 mol% (77). A técnica de FCS se torna ainda mais útil, já que as concentrações de sonda utilizadas devem ser da ordem de até 10 nM, o que representa, para as concentrações de lipídios utilizadas, 10^{-3} mol%.

Há estudos por espectroscopia de fluorescência sobre a organização e dinâmica dessas sondas caracterizando suas propriedades de fluorescência como tempo de vida de fluorescência e tempo de correlação rotacional em vesículas de determinados PLs (78). Também são caracterizadas GUVs com sistemas ternários de lipídios por microscopia de fluorescência utilizando sondas com NBD (79).

Alguns experimentos exigiram o uso de outras sonda diferentes do NBD, devido à algumas limitações dessa sonda, como por exemplo o seu alto fotoclareamento, o que inviabiliza seu uso em experimentos com longo tempo de exposição da amostra à luz de excitação ou quando a concentração da sonda deve ser muito baixa e por isso a potência da luz de excitação deve ser alta.

Análogo da Miltefosina MT-EtBDP

Usamos derivado fluorescente da miltefosina, desenvolvido no laboratório do Prof. U. Acuña, do *Instituto de Química-Física “Rocasolano”, CSIC*, Espanha, com quem mantemos colaboração. Esse análogo fluorescente do fármaco mostra-se útil na determinação da distribuição e na localização de receptores intracelulares (80, 81) 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 (82). O análogo fluorescente é o MT-EtBDP (6-et-BODIPY-11C-PC, Figura 6) (83), que tem o grupo fosfocolina intacto, o qual é essencial para o efeito leishmanicida *in vivo*.

Figura 6: Molécula do análogo fluorescente do fármaco MT, MT-EtBDP (6-et-BODIPY-11C-PC ou 11-(4,4-difluoro-6-etil-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-2-il)*n*-undecil-fosfatidilcolina).

DiI_{C18}

O DiI é um marcador de membrana lipofílico que apresenta baixa fluorescência até ser incorporado nas membranas. É um corante fluorescente laranja-vermelho com pico de absorção em torno de 550 nm e de emissão em 565 nm.

Figura 7: Molécula da sonda DiIC₁₈ (DiIC18(3) ou 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate).

2.4. Espectroscopia de fluorescência

Um experimento de espectroscopia típico é feito com a incidência de uma radiação eletromagnética em um determinado comprimento de onda λ sobre a amostra. Então, propriedades da radiação que emerge da amostra são obtidas, como 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 (84).

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 eletromagnético. 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 (85).

A luminescência é a emissão de luz de uma substância que ocorre dos estados excitados eletronicamente. A fluorescência é originária do estado excitado singleto, em que o elétron no estado excitado está pareado (com spin oposto) ao segundo elétron do orbital do estado fundamental. Com isso, o retorno ao estado fundamental é permitido e ocorre rapidamente ($\sim 10^{-9}$ s = 1 ns) pela emissão de um fóton (86).

2.4.1. Espectroscopia de fluorescência de estado estacionário

Quando a molécula absorve luz ela é levada a um estado eletrônico excitado. Nesse estado ela 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, a molécula excitada pode emitir o excesso de energia na forma de radiação, em tempos da ordem de 10^{-9} s, e. Se a radiação é espontaneamente emitida e cessa imediatamente após a interrupção da radiação de excitação, o processo é chamado de fluorescência (85).

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.

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

2.4.2. Ensaio de ditionito

É possível determinar, através do ensaio de ditionito (87), a taxa de movimento transmembrana e a distribuição dos análogos fluorescentes entre as monocamadas externa e interna da membrana (Figura 8). O ditionito de sódio reduz rapidamente a porção fluorescente do NBD em não-fluorescente em um meio-tempo de aproximadamente 20 s (Figura 9). A determinação da distribuição transmembrana é baseada no fato de que o ditionito de sódio não penetra na membrana, reduzindo somente as porções de NBD localizadas na monocamada externa.

Figura 8: Esquema do experimento de destruição da fluorescência, pelo ditionito de sódio, da sonda NBD-PE, inserida em ambas as monocamadas, interna e externa, da bicamada das vesículas.

Figura 9: Redução da sonda C6-NBD-PC localizada na monocamada externa de vesículas unilamelares pequenas (em inglês *small unilamellar vesicles*, SUVs) de DPPC a 10°C. Adaptado de: (88).

Na Figura 8 está ilustrado um esquema do experimento. Após a injeção de ditonito de sódio na solução, há uma diminuição rápida na intensidade de fluorescência. Essa diminuição corresponde à redução dos análogos localizados na monocamada externa mediada pelo ditonito de sódio. Em seguida, a intensidade de fluorescência atinge um novo platô que representa os análogos na monocamada interna. A lenta diminuição na fluorescência indica que a permeação do ditonito de sódio através da membrana e/ou o *flip-flop* do análogo fluorescente foram desprezíveis sob as condições dentro da escala de tempo do experimento.

Com a adição do Triton X-100, todos os análogos fluorescentes se tornam acessíveis ao ditonito de sódio, resultando em uma perda total da fluorescência.

As LUVs simetricamente marcadas com a sonda NBD contêm 50% do análogo em cada uma das monocamadas (88).

A cinética de redução do NBD pelo ditonito pode ser ajustada razoavelmente por uma função monoexponencial levando em consideração que o ditonito se encontra em excesso (89).

$$F(t) = F(\infty) * (1 - e^{-t*k}) \quad (1)$$

sendo $F(t)$ a fluorescência destruída num dado tempo t , $F(\infty)$ a fluorescência destruída pelo ditonito após um tempo infinito (platô), e k a constante de taxa da reação de redução do NBD pelo ditonito.

As LUVs, inicialmente a 1 mM em tampão HEPES 50 mM 100 mM NaCl, marcadas com a sonda NBD-PE 0,5 mol%, são diluídas a uma concentração de 33,3 μ M de lipídios. A intensidade de fluorescência é medida em 540 nm, com excitação em 470 nm, em um espectrômetro de fluorescência SLM-AMINCO (AMINCO-Bowman, Urbana, IL). Após 30 s

do início da medida, 50 mM (78 μ L de 1 M) de ditionito de sódio (dissolvido em tampão Tris-HCl 100mM, pH 10 há menos de 2 h) são adicionados. O ditionito rapidamente suprime a fluorescência do NBD na monocamada externa da membrana. O valor da intensidade de fluorescência atingido e mantido corresponde a moléculas de NBD-PE na monocamada interna. Para que todos os análogos estejam acessíveis ao ditionito, Triton X-100 é adicionado após 300 s do início do experimento a uma concentração final de 0,5% (90).

Os experimentos foram realizados com adição de MT na preparação das LUVs e durante as medidas.

2.4.3. Espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo

Na espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo, a amostra é excitada com um pulso de luz. Como o tempo de vida no estado excitado é da ordem de ns, a amostra é excitada por laser pulsado com largura do pulso muito menor que o tempo de decaimento τ da amostra.

A amostra é excitada resultando em uma população inicial de fluoróforos no estado excitado que decai. A emissão é um evento randômico, e cada fluoróforo excitado tem a mesma probabilidade de emitir em um dado período de tempo, resultando em um decaimento exponencial da população do estado excitado. O tempo de vida pode ser obtido a partir da inclinação do gráfico de $\log I(t)$ versus t .

Os decaimentos de intensidade de fluorescência são tipicamente ajustados por multi-exponenciais

$$I(t) = \sum_{i=1}^n \alpha_i \exp(-t/\tau_i) \quad (2)$$

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

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 (91). Os fatores pré-exponenciais α_i representam a fração de moléculas em cada uma das conformações em $t=0$, o qual corresponde ao estado fundamental de equilíbrio.

Para um fluoróforo com n tempos de decaimento, pode-se calcular o tempo de vida médio, que é dado pela relação

$$\tau_m = \frac{\sum_{i=1}^n \alpha_i \tau_i^2}{\sum_{i=1}^n \alpha_i \tau_i} \quad (3)$$

O método de contagem de fótons únicos correlacionados no tempo (em inglês, *time-correlated single photon counting*, TCSPC) se inicia com o pulso de excitação, que excita a amostra e inicia a contagem do tempo. A essência do método é o conversor tempo-amplitude (em inglês, *time-to-amplitude converter*, TAC), que pode ser considerado um análogo de um cronômetro de tempos muito curtos.

A amostra é repetidamente excitada usando uma fonte de pulso de luz (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 (em inglês, *multi-channel analyser*, MCA) converte essa voltagem para um canal de tempo usando um conversor analógico-digital (em inglês, *analog-to-digital converter*, ADC). Somando sobre vários pulsos, o MCA constroi um histograma 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 função de resposta do instrumento é a resposta do instrumento para uma amostra de tempo de vida zero e representa o perfil do tempo de vida mais curto que pode ser medido pelo instrumento. A largura à meia altura caracteriza a função. O ajuste da curva de decaimento de fluorescência é feito a partir da reconvolução da função de resposta do instrumento com o decaimento obtido para a amostra.

Para medidas com resolução temporal, o laboratório de Fotobiofísica do Departamento de Física da FFCLRP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, possui um sistema baseado no método de correlação temporal de fótons únicos, em que a fonte de excitação é um laser pulsado *Tsunami* (*Spectra Physics*) bombeado por laser de estado sólido *Millenia* (*Spectra Physics*). A frequência dos pulsos é ajustável e o comprimento de onda pode ser escolhido com o auxílio de dobradores e triplicadores de frequência. Os pulsos de emissão são detectados por fotomultiplicadora refrigerada *Hamamatsu* e são correlacionados temporalmente com os pulsos de excitação por meio de um conversor tempo-amplitude. *Software* fornecido pela *Edinburgh Instruments* é utilizado para análise inicial dos dados de decaimento da fluorescência.

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 e têm um ângulo θ entre eles. Uma causa da despolarização é a difusão rotacional dos fluoróforos. As medidas de anisotropia dão uma ideia do deslocamento angular médio do fluoróforo entre a excitação por absorção do fóton e a subsequente emissão de um fóton. 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 (91).

A anisotropia é definida pela relação

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (4)$$

Para obter os valores das intensidades $I_{\parallel}$ e $I_{\perp}$ da equação, a amostra é excitada com luz polarizada verticalmente, ou seja, com o vetor campo elétrico da luz de excitação orientado paralelamente ao eixo vertical. 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).

A difusão rotacional é o movimento de rotação das moléculas. Dependendo da simetria da molécula e do microambiente o movimento pode ocorrer isotropicamente, em torno de um eixo cilíndrico ou como oscilação em um cone (42). A constante de difusão rotacional pode ser obtida a partir dos tempos de correlação rotacional calculados em experimentos de anisotropia resolvida no tempo, no qual são obtidos os decaimentos da intensidade de fluorescência com excitação polarizada horizontal e verticalmente, e detecção paralela e perpendicular à excitação.

2.5. Microscopia óptica

A microscopia em geral é utilizada para observar amostras que não podem ser vista à olho nu, ou seja, que estão acima do limite de resolução do olho humano. A microscopia óptica é caracterizada pelo uso de luz visível, transmitida ou refletida da amostra, passando através de lentes permitindo uma visão magnificada da amostra. A imagem resultante pode ser detectada diretamente com os olhos ou capturada digitalmente por câmeras ou detectores de fótons.

Existem diferentes técnicas de microscopia óptica que podem ser utilizadas de acordo com a aplicação de interesse.

2.5.1. Microscopia de contraste de fase

A microscopia de contraste de fase mostra a diferença no índice de refração como uma diferença no contraste da imagem. O contraste é bem melhor que nas imagens de microscopia de campo claro. Para a realização desse tipo de microscopia, o sistema conta com um anel circular no condensador, produzindo um cone de luz. O cone se sobrepõe a um anel com tamanho similar na objetiva. É gerada então uma diferença de fase artificial de aproximadamente um quarto do comprimento de onda, ocorrendo interferência com a luz difratada. O resultado é a imagem por contraste de fase.

Os experimentos de microscopia de contraste de fase foram realizados em laboratório do Departamento de Biofísica da Unifesp de São Paulo. O laboratório conta com um microscópio *Zeiss Axiovert 200* com sistema de microinjeção acoplado que permite a adição de soluções na amostra durante a medida, além da câmera Zeiss HSm com alta taxa de aquisição. Foram adquiridas quatro imagens por segundo, ou seja, uma taxa de 250 ms/imagem. A objetiva utilizada era de aumento de 63 $\times$, correspondendo a 0,25 μ m/pixel.

2.5.2. Microscopia de contraste por interferência diferencial

A microscopia de contraste por interferência diferencial (DIC, do inglês, *differential interference contrast microscopy*), tem como resultado uma imagem em relevo gerada pela diferença na densidade óptica.

O sistema consiste em um prisma Nomarski no condensador que divide a luz em dois feixes, o ordinário e o extraordinário. A diferença espacial entre os dois feixes é mínima (menor que a resolução máxima da objetiva). Após a passagem pela amostra, os feixes são reunidos por um prisma similar na objetiva.

Na amostra, próximo a uma fronteira de índice de refração, a diferença entre os feixes gera um relevo na imagem.

Para os experimentos de DIC, foi utilizado o sistema com microscópios confocais de varredura de laser (*FluoView-1000*, *Olympus*, Hamburg, Alemanha e Tokyo, Japão), do laboratório do Grupo de Biofísica Molecular do Instituto de Biologia da Universidade Humboldt de Berlim, na Alemanha, com uma objetiva de água UPLSAPO 60 $\times$ (N.A. 1,2).

2.6. Microscopia de fluorescência

Um microscópio de fluorescência convencional difere de um microscópio padrão pela fonte de luz (lâmpada de xenônio ou mercúrio), que produz luz UV-visível. O comprimento de onda de excitação é selecionado por um filtro de interferência ou um monocromador. A observação da fluorescência pode ser feita por olho ou uma câmera. A profundidade do campo na amostra é de 2 a 3 μm e a resolução máxima é aproximadamente metade do comprimento de onda de excitação. A alta taxa de aquisição de uma boa câmera CCD (sigla do inglês, *charge-coupled device*) permite imagens da dinâmica da interação com as GUVs (92).

Os experimentos de microscopia de fluorescência foram realizados em laboratório do Departamento de Biofísica da Unifesp de São Paulo com o mesmo microscópio *Zeiss Axiovert 200* utilizado para os experimentos de microscopia de contraste de fase.

Juntamente com as imagens de fluorescência foram adquiridas imagens de contraste de fase, que permitem a visualização das GUVs pelo contraste gerado pela diferença de densidade das soluções interna (sacarose), e externa (glicose), e uma mistura, sem rompimento da membrana, entre os meios interno e externo provoca a perda do contraste nessa imagem, trazendo informações extras que não podem ser visualizadas apenas por fluorescência.

2.6.1. Microscopia confocal de fluorescência

Em um microscópio confocal, um feixe de laser em um foco varre a amostra. A fluorescência emitida pela amostra é separada do feixe incidente por um espelho dicróico e o feixe passa através de lentes para que o feixe esteja focado em uma abertura *pinhole* e atinge o detector. A fluorescência dos planos fora de foco acima e abaixo da amostra atingem as paredes da abertura e não pode passar através do *pinhole* (Figura 10).

Figura 10: Princípio da imagem confocal. O *pinhole* no plano intermediário da imagem assegura que somente o plano em foco da luz atinja o detector, o que permite a aquisição de imagens com resolução próxima ao limite de difração. Adaptado de: (93).

A varredura é feita a partir de espelhos vibrando ou um disco girando com diversos *pinholes* em arranjo espiral (disco de Nipkow). Na microscopia confocal com varredura do laser, as imagens são armazenadas no computador. Um dos recursos da microscopia confocal é a possibilidade de obter fatias de espessura definida através da profundidade da amostra. Usando uma objetiva de alta abertura numérica, a espessura das secções confocais pode atingir o limite teórico de aproximadamente $0,5\ \mu\text{m}$. Portanto, obtendo a imagem de diferentes secções é possível reconstruir uma imagem tridimensional (3D) (92).

Como a microscopia confocal coleta apenas uma fração dos fótons emitidos pela amostra, a energia de excitação necessária deve ser maior do que na microscopia de fluorescência convencional. Por isso a taxa de fotoclareamento pode ser maior, o que é diminuído com a varredura da amostra pelo feixe de laser. Para evitar esse problema deve-se utilizar fluoróforos mais estáveis e utilizar baixa potência do laser, alta sensibilidade do detector, e máxima abertura numérica da objetiva.

As imagens de microscopia confocal foram obtidas com microscópios confocais de varredura de laser (*FluoView-1000*, *Olympus*, Hamburg, Alemanha e Tokyo, Japão), do laboratório do Grupo de Biofísica Molecular do Instituto de Biologia da Universidade Humboldt de Berlim, na Alemanha, com uma objetiva de água UPLSAPO 60 $\times$ (N.A. 1,2) a temperatura ambiente.

A sonda NBD foi excitada com a linha de 488 nm do laser de Ar-ion (*Melles Griot*, Bensheim, Alemanha) e a emissão foi observada entre 500 e 510 nm.

As GUVs foram colocadas em lamínulas de 14 mm de vidro em placas de cultura *MatTek* cobertas com poly-d-lysine, e antes das medidas foi aguardado pelo menos 5 min para que as vesículas depositassem na superfície e tivessem o mínimo de movimento ao longo das medidas.

As imagens foram feitas em cortes no eixo z (no plano xy) com resolução de 512×512 pixels. Foram adquiridas 1) imagens da área máxima sem zoom ($210 \times 210 \mu\text{m}^2$), 2) imagens com zoom de $3\times$ para obter $70 \times 70 \mu\text{m}^2$, e 3) várias imagens ao longo do tempo para obter a dinâmica da ação da MT nas vesículas. 4) Imagens reconstruídas em três dimensões (3D) das GUVs foram obtidas a partir da aquisição do ápice até a parte mais baixa da GUV com incrementos de $0,5 \mu\text{m}$.

Todas essas imagens foram visualizadas no *software FluoView-1000*. O processamento das imagens, como a reconstrução 3D, foi feito com o *software* livre *ImageJ*.

Simultaneamente foram registradas imagens de DIC (em inglês *differential interference contrast microscopy*), que sobrepostas às imagens de fluorescência permitem a visualização das bicamadas das vesículas mesmo em regiões não-fluorescentes.

2.6.2. Espectroscopia de correlação de fluorescência

A espectroscopia de correlação de fluorescência (em inglês FCS, *fluorescence correlation spectroscopy*) é uma técnica que permite estudar interações moleculares, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, com alta resolução espacial e temporal, trazendo informações da mobilidade molecular e de reações fotofísicas e fotoquímicas, e pode ser aplicada para sondas e biomoléculas extremamente diluídas (94). Essa técnica é caracterizada pela medida de flutuações espontâneas muito pequenas na emissão de fluorescência das moléculas. Suas aplicações se iniciam na medida da difusão, passam pela investigação da concentração de partículas e sua mobilidade, até medidas de moléculas únicas. Para aumentar a sensibilidade da detecção e suprimir o ruído de fundo, a técnica é combinada com uma configuração confocal (Figura 10).

Os dados adquiridos apresentam a intensidade de fluorescência em função do tempo (Figura 11a). Como a concentração de moléculas fluorescentes utilizada é muito baixa (da ordem de nanomolar, nM), e o volume focal é muito pequeno (da ordem de um fentolitro, 1 fL) devido ao aparato confocal, pequenas variações nessa intensidade de fluorescência podem ser observadas como picos nos dados.

Figura 11: Dados típicos obtidos em uma medida de FCS de uma solução com concentração de nanomolar: (a) traço de contagem molecular (*MCS trace*) e (b) função de autocorrelação de FCS e FLCS.

A intensidade é temporalmente autocorrelacionada, resultando em uma curva que pode ser ajustada pela função de autocorrelação (Figura 11b):

$$G(\tau) = \frac{\langle F(t) \cdot F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} + 1 \quad (5)$$

sendo $\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle$ e $\langle F(t) \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T F(t) dt$.

Se considerarmos uma difusão browniana com perfil do volume confocal gaussiano em três dimensões, a função de autocorrelação é dada por:

$$G(\tau) = \sum_{i=1}^n \rho_i \left(1 + \frac{\tau}{\tau_i}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_i \kappa^2}\right)^{-1/2} \quad (6)$$

com $\kappa = \frac{z_0}{w_0}$, $V_{ef} = \pi^{3/2} w_0^2 z_0^2$, $\langle C \rangle = \frac{\langle N \rangle}{V_{ef} N_A}$, $D_i = \frac{w_0^2}{4\tau_i}$ e $\sum_i \rho_i = \frac{1}{\langle N \rangle}$. O volume de observação V_{ef} é um perfil gaussiano tridimensional, com raio w_0 no plano xy e dimensão z_0 na direção axial z . Os tempos de difusão são τ_i , e D_i são os coeficientes de difusão, sendo n o número de espécies difundindo livremente. Também são obtidos os valores médios da concentração, $\langle C \rangle$, e do número de partículas, $\langle N \rangle$, no volume focal.

Diferenças na concentração da sonda podem ocorrer em diferentes vesículas, e por isso a amplitude de autocorrelação pode variar (95). Por isso as curvas foram normalizadas para $G(\tau)$, multiplicando a função por $\langle N \rangle$.

Há modelos para as flutuações que consideram o transporte ativo de moléculas pelo volume focal, o estado tripleto, entre outros. Cada modelo é específico para alguns tipos de sistema e os parâmetros devem ser interpretados de acordo com o que se está observando, ou seja, há uma falta de modelos adequados para interpretação em diferentes condições. As funções de autocorrelação devem ser obtidas para cada condição quando não for padrão.

A equação de Stokes-Einstein relaciona o raio hidrodinâmico, R , da partícula em solução (considerada esférica) com o seu coeficiente de difusão, D :

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R} \quad (7)$$

sendo η a viscosidade do meio, T a temperatura e k a constante de Boltzmann. Assim é possível obter o tamanho da partícula a partir das medidas de FCS.

A técnica permite a determinação de propriedades de difusão moleculares de até moléculas únicas. Microdomínios lipídicos (*rafts*) podem ser estudados em membranas artificiais (GUVs) com diferentes composições lipídicas, assim como efeito do colesterol nas propriedades de difusão de moléculas marcadoras específicas (96-99). Esses sistemas modelo são importantes para o entendimento da dinâmica de membranas (100). As fases nessas membranas, tais como a líquido-ordenada e a líquido-desordenada, apresentam diferentes viscosidades, sendo a mobilidade molecular uma informação da estrutura local da membrana e do comportamento de partição das moléculas (101). A mobilidade molecular nas diferentes fases presentes em vesículas formadas por misturas de lipídios, com o coeficiente de difusão dependendo do tipo de fase, e também da composição exata da fase, com as razões molares dos lipídios, podem ser obtidos por FCS (102).

A técnica de FLCS (em inglês *fluorescence lifetime correlation spectroscopy*), que combina o FCS com o TCSPC, permite a eliminação de efeitos de detecção chamados de *afterpulsing*, assim como a influência da luz retroespalhada e da luz de fundo. Para essa

técnica é necessário utilizar um laser de excitação pulsado, com pulsos de pico- a fentossegundos (103).

As sondas fluorescentes e métodos relacionados (como FRAP: *fluorescence recovery after photobleaching* e FCS) são ferramentas capazes de medir as constantes de difusão lateral de moléculas na membrana, já que a molécula de interesse age frequentemente como um carreador da sonda fluorescente. Os valores obtidos para a difusão lateral de moléculas fosfolipídicas difundindo livremente no plano da bicamada são extremamente altos, tipicamente da ordem de $10^{-7} - 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ a 25°C (32, 42).

Para as medidas de FCS foi utilizado o mesmo equipamento multiusuário *MicroTime 200*, da *PicoQuant* do laboratório de Fotobiofísica, do Departamento de Física, na FFCLRP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Os experimentos foram realizados utilizando uma objetiva *Olympus UPlanSApo* de imersão em água com aumento de 60× e abertura numérica de 1,2. Um volume de 50 ou 100 µL da solução é colocado sobre uma lamínula de vidro, sendo as medidas de FCS feitas 20 µm acima da superfície. Para a sonda utilizada (NBD), a amostra foi excitada com o *laser* de diodo pulsado LDH-D-C-470 de 470 nm com frequência de 40 MHz e potência de excitação de até 50 µW na objetiva. O dícroico utilizado é o 490dcxr da *Chroma AHF* e a posição do tubo de lentes foi fixada em 28,0 mm, focando o feixe de emissão no *pinhole* de 50 µm. Para a emissão foi utilizado o filtro BLP01-488R da *Semrock AHF*. A detecção foi feita por um detector MPD SPAD com área sensível de 50 µm². Antes de iniciar as medidas, o sistema é realinhado para maximizar a coleta do feixe de emissão através do seu alinhamento no *pinhole* e na área do detector.

As medidas de FCS das LUVs foram feitas com uma aquisição de 5 min, e repetidas de 2 a 5 vezes para cada amostra a fim de fazer uma média para obter o coeficiente de difusão. O ponto de medida nas GUVs foi focado na bicamada superior no polo.

2.6.3. Microscopia de imagem por tempo de vida de fluorescência

A microscopia de imagem por tempo de vida de fluorescência (em inglês FLIM, *fluorescence lifetime imaging microscopy*) utiliza diferenças no tempo de vida de estado excitado dos fluoróforos como mecanismo de contraste para a imagem. Como o tempo de vida de estado excitado de um fluoróforo é sensível ao seu microambiente, a imagem desse parâmetro informa complementarmente sobre parâmetros físicos locais (como, por exemplo,

microviscosidade) e parâmetros químicos (como, por exemplo, pH, concentração iônica), além das informações obtidas a partir das características de estado estacionário (espectro de fluorescência, espectro de excitação e anisotropia). Em células vivas é possível discriminar entre autofluorescência e a real fluorescência que se deseja medir a partir das diferenças de tempo de vida. Várias aplicações da técnica tem sido relatadas, dentre elas imagem de cálcio e outros compostos químicos, determinação da fluidez da membrana (que é de interesse nesse trabalho), observação de transporte e fusão, imagem usando transferência de energia por ressonância (em inglês *resonance energy transfer*, RET) para quantificar a distância entre duas espécies marcadas com dois diferentes fluoróforos (doador e aceitador de energia), determinação de sequenciamento de DNA, imagem clínica (por exemplo, uso de anticorpos e ácido nucleicos marcados com fluoróforos para medidas quantitativas de marcadores de doenças múltiplas em células individuais de amostras de pacientes, etc) (92).

Essa técnica de imagem é utilizada para estudar a dinâmica de membranas, já que permite a determinação de variações locais no meio, como a microviscosidade e fluidez (93). Já existem estudos de FLIM das sondas NBD-lipídios com análise das distribuições de tempo de vida em GUVs com diferentes composições de FLs, ELs e colesterol (104).

A imagem por tempo de vida pode ser feita tanto por métodos no domínio da frequência como no tempo. Trataremos aqui no domínio do tempo. Em princípio a imagem por tempo de vida poderia ser feita simplesmente pela combinação da técnica de contagem de fótons únicos com técnicas de varredura. Para que o tempo de aquisição seja razoável, é necessária uma alta taxa de repetição que permita a aquisição de um grande número de fótons em um curto período de tempo, já que se deve obter uma curva de decaimento para cada pixel da imagem.

O equipamento multiusuário *MicroTime 200*, da *PicoQuant*, instalado no laboratório de Fotobiofísica, do Departamento de Física, na FFCLRP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, é um microscópio confocal com resolução temporal, e permite medidas de FLIM e FCS.

O aparato experimental do microscópio consiste em um microscópio invertido (*Olympus IX-71*) com um feixe de *laser* (de diodo da *Pico Quant*) direcionado por um espelho dicróico em direção à objetiva. A emissão fluorescente é coletada pela mesma objetiva e transmitida pelo espelho dicróico, passando por um tubo de lentes que foca a emissão de fluorescência coletada em um *pinhole*, o qual seleciona o plano da imagem e rejeita luz originada fora de foco. O feixe então é direcionado por espelhos para um detector do tipo SPAD (*Single Photon Avalanche Diodes*, ou seja, detector de fóton único por fotodiodo de

avalanche), ou pode ser dividido em dois feixes permitindo uma correlação cruzada entre dois detectores. A aquisição e análise dos dados é feita no *software SymPhoTime v. 5.2.4*.

Os experimentos realizados no microscópio foram feitos utilizando uma lamínula de vidro, sobre a qual foi colocado um volume de 50 ou 100 μL da suspensão de GUVs e as medidas de FLIM foram feitas na superfície da lamínula. Como a sonda utilizada foi o NBD, foi utilizado para excitar a amostra o *laser* de diodo pulsado LDH-D-C-470 de 470 nm. Para a emissão foi utilizado o filtro BLP01-488R da *Semrock AHF*. A frequência dos pulsos utilizada é de 40 MHz. Foi utilizada uma objetiva *Olympus UPlanSApo* de imersão em água com aumento de $60\times$ e abertura numérica de 1,2, com o colar de correção ajustado em 0,15, correspondente à espessura da lamínula. A potência de excitação na objetiva não ultrapassou 50 μW . O dícroico utilizado é o 490dcxr da *Chroma AHF*. A posição do tubo de lentes foi fixada em 28,0 mm, focando o feixe de emissão no *pinhole* de 50 μm . Sempre antes de iniciar as medidas, o sistema é realinhado a fim de maximizar a coleta do feixe de emissão através do seu correto alinhamento no *pinhole* e na área do detector utilizado. A detecção foi feita por um detector MPD SPAD com área sensível de 50 μm^2 .

Para as medidas de FLIM, a amostra é varrida com o movimento da objetiva monodirecional em uma área de $80 \times 80 \mu\text{m}^2$ com uma precisão de posicionamento nominal de 1 nm, na qual pode ser feito um *zoom*. Essa varredura pode ser feita também nos planos *xz* e *yz*.

Também foi utilizado o mesmo microscópio confocal do laboratório do Grupo de Biofísica Molecular do Instituto de Biologia da Universidade Humboldt de Berlim, na Alemanha, modificado para medidas de FLIM com um LSM (*laser scanning microscope Upgrade kit* (*PicoQuant*, Berlin, Alemanha), ou seja, acessórios para o microscópio confocal, como lasers pulsados para a excitação e detectores SPAD e sistema de TCSPC para cálculo do tempo de vida de fluorescência e processamento e geração das imagens de tempo de vida. O tamanho da imagem é de 512×512 pixels. A sonda NBD foi excitada usando um laser de diodo pulsado de 485 nm com frequência de pulsos de 10 MHz e detectado usando um fotodiodo de avalanche de fótons τ (τ -SPAD, *PicoQuant*, Berlin, Alemanha) equipado com um filtro passa-banda 540/40. Os sinais de SPAD são processados por uma placa de contagem de fótons *TimeHarp 300* e analisados com o *software SymPhoTime 64* (*PicoQuant*, Berlin, Alemanha). As imagens foram acumuladas por 98 s com uma taxa de aproximadamente 80 a 100 mil contagens/segundo e analisadas usando o *software SymPhoTime 64*.

2.7. Técnicas complementares

As técnicas complementares utilizadas foram importantes para o controle e determinação das condições experimentais de trabalho das amostras. A técnica de DLS foi utilizada para controle do tamanho e integridade das LUVs, enquanto a técnica de DSC foi utilizada para determinação do estado físico das bicamadas na temperatura utilizada nos experimentos.

Outra técnica também utilizada para corroborar os resultados obtidos com as técnicas de fluorescência foi a espectroscopia por ESR.

2.7.1. Espalhamento dinâmico de luz

O espalhamento dinâmico de luz (em inglês DLS, *dynamic light scattering*) é uma técnica muito utilizada para a verificação do tamanho de objetos espalhadores. Neste trabalho a técnica será utilizada para obter o diâmetro de vesículas extrusadas, o qual deve resultar em partículas monodispersas com tamanho próximo ao do poro da membrana utilizada no processo de extrusão.

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 fótons (PCS, em inglês *photon correlation spectroscopy*). Uma das características das partículas em solução é que elas estão em constante movimento térmico, ou browniano. Esse movimento provoca um padrão de variação na intensidade de luz espalhada pelas partículas, e pode ser detectado como uma variação temporal na intensidade. 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 fótons utiliza a função de correlação dessas flutuações para determinar a distribuição de tamanhos das partículas espalhadoras de luz (105).

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 autocorrelação 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 autocorrelação em distribuição de tamanhos.

As medidas de DLS são feitas para determinar o tamanho das vesículas preparadas e o índice de polidispersividade da distribuição dos tamanhos.

Foram feitas essas medidas em dois equipamentos, um deles é o *Zetasizer 3000HS_A* da *Malvern Instruments*, pertencente ao Laboratório de Físico-Química do Departamento de Química da FFCLRP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. Esse equipamento possui um sistema medidor de tamanho de partículas. São obtidos gráficos da distribuição de tamanhos do diâmetro das partículas, a qual foi calculada pelo algoritmo CONTIN, disponível no *Software* do equipamento.

A técnica foi utilizada também para o controle da integridade das LUVs preparadas para as medidas de ESR que, por terem uma concentração de lipídios de 2 mM, a concentração de MT de 5 mol% equivale a 100 μ M, o dobro da CMC do composto. O equipamento utilizado para tais medidas foi o *DynaPro NanoStar*, do Instituto de Biologia da Universidade Humboldt de Berlim, na Alemanha, com um laser GaAs de 100 mW integrado de 658 nm (*Wyatt Technology*). O tampão utilizado para a diluição da suspensão de LUVs até 5 μ M foi filtrado em filtro Millex de poros de 0,22 μ m.

2.7.2. Calorimetria diferencial de varredura

A técnica de calorimetria diferencial de varredura (em inglês DSC, *differential scanning calorimetry*) é muito utilizada para a determinação da temperatura de transição de fase lipídica de vesículas fosfolipídicas. É uma técnica que consiste na medida da diferença entre a quantidade de calor fornecida para aumentar a temperatura, da amostra e de uma referência, em função da temperatura. A temperatura deve aumentar linearmente com o tempo em ambos os suportes, da amostra e da referência.

O princípio por trás da técnica é que quando a amostra sofre uma transição de fase, mais calor (quando o processo é endotérmico), ou menos (para um processo exotérmico), deve fluir por ela que pela referência para manter ambas em mesma temperatura. Assim, numa curva da diferença de calor entre a amostra e a referência, haverá um pico máximo na

temperatura de transição, e a área da curva será correspondente à quantidade de calor (ΔH) necessária para a transição.

De forma complementar, as medidas de DSC realizadas, permitem caracterizar a transição de fase entre as fases gel e líquido-cristalina das vesículas lipídicas, que é um parâmetro importante e que varia dependendo da composição percentual de cada lipídio utilizado na preparação das vesículas. Esse método também pode ser utilizado para observar mudanças provocadas pela adição de sondas ou até mesmo das diferentes concentrações do fármaco.

O equipamento utilizado é o *N-DSC-II*, da *Calorimetry Sciences Corporation*, pertencente ao Laboratório de Bioquímica do Departamento de Química da FFCLRP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. As varreduras de aquecimento e esfriamento foram feitas entre 0°C e 50°C, com velocidade de 1°C/min.

2.7.3. Espectroscopia de ressonância de spin do elétron

A técnica de espectroscopia de ressonância do spin do elétron (em inglês ESR, *electron spin resonance*), utiliza-se do sinal de um elétron desemparelhado.

Quando em um campo magnético, o spin do elétron apresenta níveis de energia, que pode assumir dois valores. Quando a amostra é exposta à radiação eletromagnética de frequência determinada, a absorção ocorre nas condições de ressonância.

O traço mais importante dos espectros de ESR é a estrutura hiperfina, um desdobramento das linhas de ressonância em vários componentes que podem ser atribuídos a interações do elétron com o núcleo, ou seja, a interação magnética do spin do elétron com momentos de dipolo magnético dos núcleos do radical (85).

Como uma bicamada fosfolipídica normalmente não apresenta sinal de ESR, sondas marcadas com spin, que apresentam um elétron desemparelhado, são inseridas na bicamada, e são sensíveis para monitorar as condições estruturais e dinâmicas da mesma (106).

As sondas com radicais nitróxido normalmente apresentam três linhas (como ilustrado na Figura 12), que se originam das interações nucleares hiperfinas do elétron com o núcleo de nitrogênio. O número quântico de spin nuclear I do nitrogênio é 1, e há $2I + 1$ linhas produzidas pela interação de um elétron com um núcleo com número quântico de spin I . O formato e a largura da linha são determinados pela anisotropia da interação hiperfina nuclear do nitrogênio e do fator g para o grupo nitróxido. A intensidade das linhas de campo maior e

menor depende da anisotropia da sonda na amostra. O grau de anisotropia desses parâmetros é, por sua vez, sensível ao movimento molecular da sonda (106).

Figura 12: Exemplo de espectro de ESR obtido e parâmetros a serem observados como largura de pico ΔH_0 , intensidade do pico principal, h_0 , e intensidade do pico h_{-1} .

São utilizadas sondas paramagnéticas (radicais nitróxido) ligadas a moléculas lipídicas, que se localizam inseridas na bicamada, em diferentes profundidades, dependendo do carbono em que ela está ligada na cadeia hidrocarbônica. Então, analisando os componentes paralelo e perpendicular do acoplamento hiperfino, pode-se observar se o movimento das cadeias hidrocarbônicas onde a sonda se localiza é isotrópico ou anisotrópico. Linhas espectrais mais largas que em meio aquoso indicam que a viscosidade local é bem mais alta. O movimento da sonda localizada em segmentos mais próximos ao grupo polar da cabeça estará normalmente mais restrito que nas partes mais distais da cadeia (32).

Para o movimento espacialmente isotrópico, o tempo de correlação rotacional pode ser calculado a partir da seguinte equação (107):

$$\tau_c = 6,5 \times 10^{-10} \Delta H_0 \left(\sqrt{\frac{h_0}{h_{-1}}} - 1 \right) \quad (0)$$

sendo ΔH_0 a largura da linha de campo médio em Gauss, e h_0 e h_{-1} as intensidades das linhas de campo médio e alto, respectivamente (Figura 12).

Uma comparação direta entre o formato dos espectros pode dar ideia do grau de ordenamento das cadeias hidrocarbônicas no interior da bicamada. Com isso é possível obter a transição de fase do lipídio utilizando uma sonda lipídica de spin que se insira na bicamada lipídica e obtendo os espectros em diversas temperaturas. Além disso, é possível observar o efeito de moléculas que podem se inserir na bicamada no ordenamento das mesmas, e esse efeito pode ser monitorado em diferentes regiões dependendo da sonda que se utiliza como,

por exemplo, as sondas 5-doxyzl-PC e 16-doxyzl-PC (Figura 13), que possuem o elétron desemparelhado em diferentes alturas da cadeia acila do lipídio a que a sonda está ligada, marcando a regiões mais próximas à região polar e a região próxima ao centro da bicamada, respectivamente.

Figura 13: Lipídios marcados com sonda de spin doxyl. (a) 1-palmitoyl-2-(5-doxyzlstearyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine (5-doxyzl-PC) e (b) 1-palmitoyl-2-(16-doxyzlstearyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine (16-doxyzl-PC).

Para o estudo da influência da miltefosina na mobilidade dos lipídios foram feitas medidas de ESR. Os espectros foram obtidos em um espectrômetro *EMX* (*Bruker*, Karlsruhe, Alemanha) pertencente ao Grupo de Biofísica Molecular do Prof. Andreas Herrmann, do Instituto de Biologia da Universidade Humboldt de Berlim, na Alemanha.

As amostras foram preparadas até três dias antes da realização dos experimentos. Foram preparadas LUVs como descrito anteriormente, com ciclos de aquecimento/congelamento, e posterior extrusão, com concentração total de lipídios de 2 mM e 50 μ M do análogo lipídico com sonda de spin, ou seja, 2,5 mol%. Foram preparadas amostras sem MT e com 5 mol% de MT, ou seja, 100 μ M de MT, e é importante notar que essa concentração de MT está acima da CMC do composto, e isso pode ter influência nos resultados.

As composições lipídicas estudadas foram de POPC puro, POPC com 10 mol% de colesterol (POPC/Col 9:1), e POPC com 10 mol% de colesterol e 10 mol% de ceramida (POPC/Col/Cer 8:1:1), além de DPPC puro. As suspensões de LUVs extrusadas foram transferidas para micropipetas de 50 μ L e seladas com massa de modelar, e colocadas em capilares de quartzo.

Para as medidas foram utilizados como parâmetros uma potência de 20 mW, amplitude de modulação de 1 G (2 G para as LUVs de DPPC), intervalo de *scan* de 100 G,

acumulação de 4 para a sonda 16-doxyl-PC (9 para as LUVs de DPPC) e 10 para a 5-doxyl-PC. O *software WinEPR* (Bruker, Karlsruhe, Alemanha) foi utilizado para extrair os parâmetros dos espectros. Os espectros foram obtidos no intervalo de temperaturas entre 273 K (0°C) e 318 K (45°C) para a sonda 16-doxyl-PC, e 323 K (50°C) para a sonda 5-doxyl-PC.

2.8. Procedimentos experimentais

As análises gráficas dos dados ao longo do trabalho e os gráficos apresentados nas figuras foram feitos utilizando o *software Origin* versão 8.5.

Capítulo 3. Resultados e Discussão

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos, sua análise e uma discussão. O capítulo está dividido em três partes. Na primeira, apresentamos os resultados de estudos espectroscópicos com vesículas grandes (LUVs) e efeitos provocados pela miltefosina. Na segunda, descrevemos resultados obtidos com o análogo fluorescente MT-EtBDP em LUVs, e na terceira parte mostramos os resultados dos experimentos de microscopia em vesículas unilamelares gigantes (GUVs).

3.1. *Interação da miltefosina com LUVs*

Foi estudada a interação entre a miltefosina e quatro tipos de vesículas unilamelares grandes (LUVs):

- i) formadas por apenas um tipo de fosfolípido, utilizando DMPC, DPPC e POPC;
- ii) LUVs com dois componentes fosfolipídicos: POPC/DPPC (1:1 e 7:3);
- iii) vesículas de POPC/colesterol (5:1, 9:1, 7:3);
- iv) vesículas POPC/colesterol/ceramida (8:1:1).

O efeito do colesterol em membranas modelo é bem conhecido (102), e é importante estudar a influência desse lipídio na interação da miltefosina com as membranas modelo. Além disso, foram estudadas vesículas formadas por POPC/colesterol/ceramida, pois a ceramida é um esfingolípido importante na membrana da *Leishmania*. Damos preferência a preparações com ceramida porque, embora a esfingomielina seja largamente estudada por ser um componente importante das células de mamíferos, ela não é sintetizada pela *Leishmania* (31).

Os estudos com as LUVs foram realizados utilizando diversas técnicas espectroscópicas (DSC, DLS, fluorescência e ESR), e os resultados são apresentados de acordo com a técnica empregada.

Como em outros organismos, os esfingolípídios da *Leishmania* (em maior parte IPC e ceramida) e esteróis são enriquecidos em microdomínios organizados nas membranas, os *rafts* lipídicos, enquanto ester fosfolípídios como diacil fosfocolinas são normalmente encontrados em estados mais fluidos e desordenados devido às suas cadeias de ácidos graxos saturadas e baixas temperaturas de transição de fase (25).

As propriedades dos *rafts* lipídicos, em particular a imiscibilidade com os lipídios do resto da membrana, se assemelham às da fase l_o , que é descrita em bicamadas lipídicas que contêm colesterol. Por isso é importante estudar sistemas de membrana modelo com coexistência de fases l_d - l_o como modelos de formação de *rafts* em membranas biológicas. Sistemas ternários de lipídios compostos por um fosfolipídio de alto ponto de fusão e um de baixo ponto de fusão, com colesterol, são escolhas muito usadas para esses estudos. Mas a substituição de um lipídio por outro em misturas binárias ou ternárias pode perturbar a partição preferencial da sonda fluorescente (108).

A presença de colesterol em membranas de DLPC provoca uma diminuição no coeficiente de difusão sem surgimento de outra fase nas imagens de FLIM. Já em vesículas de DPPC, a presença de colesterol leva a membrana à fase fluida (109). O efeito do colesterol ocorre na região dos seis ou sete primeiros carbonos da cadeia fosfolipídica, onde se localiza o anel maior do esterol, e há uma diminuição da mobilidade, diminuindo o ângulo de inclinação, mas o efeito na porção central da bicamada, onde a cadeia ramificada do colesterol está localizada, é de aumento da fluidez.

Qualquer composto anfifílico é capaz de se inserir em vesículas fosfolipídicas devido à natureza não específica da interação hidrofóbica, mas essa inserção não ocorre em bicamadas com as cadeias hidrofóbicas ordenadas, como as formadas por fosfolipídios puros com cadeias acila saturadas, sem rompimento da estrutura ordenada.

É importante observar que a miltefosina é um surfactante, e surfactantes e lipídios têm o mesmo tipo de estrutura, mas, em geral, diferem consideravelmente no balanço hidrofílico-lipofílico, que se manifesta na concentração de espécies monoméricas que podem existir em solução aquosa. A interação ocorre como esquematizado na Figura 14.

Figura 14: Representação esquemática da sequência de eventos a partir da exposição de uma bicamada fosfolipídica (FL) a quantidades crescentes de surfactante (S). Adaptado de: (33).

Quando surfactante é adicionado, os monômeros progressivamente penetram na bicamada fosfolipídica até ela se tornar saturada. Aumento posterior na concentração de surfactante resulta no aumento do número de micelas mistas de FL/surfactante formadas pela dissolução da bicamada até a completa solubilização das mesmas em micelas mistas, as quais entram em equilíbrio com micelas puras com futura adição de surfactante.

Os valores da concentração micelar crítica (CMC) da miltefosina encontrados na literatura são divergentes (de 2 a 160 μM) (26, 110-115). Esse é um parâmetro essencial para a compreensão das propriedades de agregação em meio aquoso e empregamos dois métodos para a sua determinação: medidas de tensão superficial, pela técnica da gota pendente, e espectroscopia de fluorescência, utilizando o composto Ahba, que foi caracterizado como uma sonda apropriada para estudos de propriedades de micelas e vesículas (70, 116). Obtivemos o valor da CMC de 50 μM em tampão fosfato 10 mM, pH 7,4 (117, 118).

3.1.1. Medidas de DSC e transições de fase em LUVs

Medidas de DSC foram realizadas com o objetivo de caracterizar a transição de fase e obter a temperatura de transição de algumas das suspensões com misturas de lipídios já que esses dados não são conhecidos como para bicamadas lipídicas com apenas um componente fosfolipídico e dependem da proporção relativa entre os lipídios utilizados. A temperatura de transição dos lipídios DMPC, DPPC e POPC já foi bastante estudada e os valores são, respectivamente $(23,6 \pm 1,5) ^\circ\text{C}$; $(41,3 \pm 1,8) ^\circ\text{C}$ e $(-2,5 \pm 2,4) ^\circ\text{C}$ (44). A natureza das cadeias hidrocarbônicas é importante, pois, se são todas saturadas, as bicamadas formadas apresentam um interior hidrofóbico ordenado abaixo da temperatura de transição, enquanto cadeias saturadas e insaturadas misturadas formam bicamadas com o interior hidrofóbico fluido em temperaturas já abaixo da temperatura ambiente em geral.

De acordo com as medidas de DSC (Figura 15), a temperatura de transição para as LUVs formadas pela mistura de POPC/DPPC 1:1 é de 30°C , ou seja, está acima da temperatura ambiente de 25°C . Portanto, na temperatura ambiente, as membranas das misturas POPC/DPPC 1:1 se encontram na fase gel.

Figura 15: Curva de DSC para LUVs de POPC/DPPC 1:1.

Foram realizados experimentos com LUVs de POPC puro e POPC/colesterol 5:1, com varreduras entre 0 e 40°C, intervalo no qual não foi encontrado nenhum pico. Para o POPC esse resultado já era esperado já que a temperatura de transição do POPC, já conhecida, está abaixo de 0°C. Já quando o colesterol é adicionado a bicamadas fosfolipídicas, é imediatamente incorporado, provocando efeitos na fluidez local (32). Como apresentado na Figura 3, a inserção de colesterol nas bicamadas lipídicas tende a diminuir a fluidez da membrana, mas também impede, em altas concentrações, que as cadeias de hidrocarbonetos se aproximem e cristalizem, inibindo possíveis transições de fase (49). Nas vesículas que preparamos, com POPC/Col 5:1 predomina o efeito de diminuição de fluidez.

Assim, acrescentamos aos dados já conhecidos sobre as temperaturas de transição de fase em vesículas de DPPC ou POPC, a verificação que em vesículas de POPC/DPPC 1:1 a transição ocorre a 30°C e que em POPC/Col 5:1 não se observa transição na faixa entre 0 e 40°C.

3.1.2. Medidas de DLS

Medidas de DLS foram realizadas para confirmar o tamanho e a monodispersão de suspensões de LUVs. Como nos experimentos de DSC, as medidas foram feitas em vesículas contendo um único fosfolipídio (POPC ou DPPC), e misturas de fosfolipídios (POPC/DPPC), de fosfolipídios e colesterol (POPC/Col), e de fosfolipídios, colesterol e ceramida (POPC/Col/Cer). Examinamos também os efeitos produzidos por sondas fluorescentes e de spin, e pela miltefosina nas dimensões e dispersão das vesículas.

Tabela 1 - Resultados das medidas de DLS, feitas a temperatura ambiente, em LUVs de POPC (1 mM) com diferentes composições e com a presença das sondas fluorescentes NBD-lipídios. Os valores d são os diâmetros e p os índices de polidispersividade.

Composição Lipídica	Sonda	d (nm)	p
POPC	---	93 ± 61	---
POPC/Colesterol 5:1	---	158 ± 43	---
	NBD-PE	113 ± 16	$0,17 \pm 0,02$
POPC/DPPC 1:1	C6-NBD-PC	102 ± 16	$0,16 \pm 0,02$
	C12-NBD-PC	102 ± 19	$0,12 \pm 0,03$

Os dados da Tabela 1 mostram que as LUVs de POPC, formadas pelo método de extrusão, possuem diâmetro próximo a 100 nm, que é o diâmetro dos poros das membranas de policarbonato utilizadas. Também é possível observar que a adição de colesterol aumenta o diâmetro das LUVs em cerca de 50%. Um pequeno aumento de diâmetro, da ordem de 10%, é observado em vesículas de misturas POPC/DPPC 1:1, sendo que a influência das sondas fluorescentes nas dimensões das vesículas é muito pequena, compatível com a proporção de sonda utilizada, de apenas 1 mol%.

Medidas de DLS também foram realizadas com as LUVs preparadas para os experimentos de ESR para avaliar a integridade delas na presença das sondas de spin e na presença de 5 mol% de MT. Os resultados mostram que as sondas de spin produzem aumento da ordem de 20% nos raios das vesículas, que apresentam ainda crescimento adicional de 10 % com o acréscimo de ceramida (Tabela 2).

Tabela 2 - Efeitos das sondas de spin 5-doxyl-PC ou 16-doxyl-PC (2,5 mol%), e da droga MT (5 mol%) sobre os resultados das medidas de DLS, em LUVs de diferentes composições. r : raios e p : índices de polidispersividade, valor médio com respectivo desvio-padrão. Temperatura ambiente.

Composição Lipídica	Sonda	Sem MT		Com MT 5 mol%	
		r (nm)	p	r (nm)	p
	---	47 ± 30	---	--	--
POPC	16-doxyl-PC	$61,1 \pm 2,4$	$0,150 \pm 0,102$	$55,6 \pm 3,1$	$0,175 \pm 0,051$
	5-doxyl-PC	$59,5 \pm 0,2$	$0,166 \pm 0,001$	$54,5 \pm 0,2$	$0,148 \pm 0,046$
POPC/Col 9:1	16-doxyl-PC	$60,5 \pm 2,4$	$0,173 \pm 0,021$	$55,4 \pm 0,4$	$0,190 \pm 0,001$
	5-doxyl-PC	$55,9 \pm 0,1$	$0,103 \pm 0,002$	$57,2 \pm 1,0$	$0,165 \pm 0,017$
POPC/Col/cer 8:1:1	16-doxyl-PC	$68,6 \pm 2,0$	$0,197 \pm 0,014$	$59,4 \pm 1,5$	$0,164 \pm 0,021$
	5-doxyl-PC	$63,3 \pm 0,9$	$0,208 \pm 0,006$	$65,7 \pm 0,5$	$0,205 \pm 0,020$
DPPC	16-doxyl-PC	$70,5 \pm 0,7$	$0,210 \pm 0,035$	$68,5 \pm 1,4$	$0,237 \pm 0,001$
	5-doxyl-PC	$73,5 \pm 1,5$	$0,238 \pm 0,001$	$68,3 \pm 1,4$	$0,237 \pm 0,001$

Verificamos também que as diferentes LUVs apresentam um diâmetro homogêneo, com índices de polidispersividade menores que 20%, com exceção para as LUVs de DPPC, mas esses valores estão ainda dentro de 25%. Em geral, nas diferentes vesículas os raios médios são ligeiramente menores na presença de MT (Figura 16). Todavia para as composições com POPC na presença de somente colesterol ou colesterol e ceramida com a sonda 5-doxy-PC, o raio tem um ligeiro aumento na presença de MT.

Figura 16: Raio médio das LUVs de diferentes composições lipídicas com (vermelho) e sem (preto) MT (5 mol%), na presença de 2,5 mol% das sondas de spin (a) 5-doxy-PC e (b) 16-doxy-PC.

3.1.3. Medidas de ESR

As medidas de ESR foram realizadas em temperaturas entre 0 e 45°C, utilizando as sondas 5-doxy-PC e 16-doxy-PC, para diferentes composições lipídicas, na ausência e na presença de 5 mol% de MT adicionada na preparação das LUVs. Os resultados obtidos estão apresentados a seguir.

Foram feitas medidas com LUVs de DPPC para observar se há alguma alteração na interação da MT com a membrana dependendo da fase em que o lipídio se encontra: gel ou fluida. As medidas foram realizadas desde 25°C, abaixo da temperatura de transição do DPPC, até 50°C, acima da temperatura de transição. A transição ocorre em torno de 41°C. Os valores da constante de acoplamento hiperfino (CAH) estão apresentados no gráfico da Figura 17a. Foi calculado, para a sonda 16-doxyl-PC, os tempos de correlação rotacional, de acordo com a Equação (4), e os dados são apresentados na Figura 17b.

Figura 17: Constante de acoplamento hiperfino (a) e tempo de correlação rotacional (b) das sondas 5-doxyl-PC (*preto*) e 16-doxyl-PC (*vermelho*) 2,5 mol% em LUVs de DPPC, na ausência (*sólidos*) e na presença (*abertos*) de MT, obtidas em temperaturas abaixo e acima da temperatura de transição do fosfolípido DPPC, desde 25°C até 50°C.

Como a sonda 5-doxyl-PC está localizada próxima à região polar da bicamada lipídica, seu grau de mobilidade é menor em relação à sonda 16-doxyl-PC, e seu espectro de ESR apresenta picos menos definidos, o que dificulta a determinação da CAH e dos parâmetros para o cálculo do tempo de correlação rotacional, principalmente em temperaturas

em que a membrana está na fase gel. Por isso são apresentados dados apenas a partir de 25°C. Pode-se notar a sensibilidade da sonda para a transição de fase lipídica, pois entre 35°C e 40°C os valores da CAH diminuem significativamente, indicando uma maior fluidez na região de inserção da sonda, e a partir de 40°C esses valores não variam (o experimento foi feito a cada 5°C e por isso não é possível determinar com precisão a temperatura de transição). Pode-se observar também que, na presença de MT, não há alteração nos valores obtidos para a CAH, independentemente de a membrana estar na fase gel ou fluida.

Já com a sonda 16-doxyl-PC, localizada na região hidrofóbica da bicamada da membrana, foi possível obter o valor desses parâmetros já a partir de 0°C (dados omitidos até 20°C), e o tempo de correlação rotacional a partir de 25°C. Os valores da CAH são menores que os da sonda 5-doxyl-PC justamente porque a região das cadeias de hidrocarboneto da bicamada tem menor restrição ao movimento da sonda. Na presença de MT esses valores são ainda menores, indicando uma maior fluidez nessa região da bicamada provocada pela MT para temperaturas abaixo da transição de fase. Acima da transição, não há variação, porque a membrana já se encontra em um estado totalmente fluido e a MT não interfere nessa fluidez. Os valores do tempo de correlação rotacional aumentam na presença da MT.

Também foram feitos experimentos com vesículas de POPC puro, POPC/Col 9:1 e POPC/Col/Cer 8:1:1. Observa-se que os valores da CAH diminuem com o aumento da temperatura, indicando um crescimento na mobilidade da sonda de spin, independente da composição lipídica. Para a membrana de POPC, que já se encontra na fase fluida em todo o intervalo de temperaturas, a presença da MT não interfere nessa fluidez, fato observado com as duas sondas. Nas vesículas contendo colesterol e colesterol/ceramida, os espectros obtidos com a sonda 16-doxyl-PC no intervalo de temperaturas entre 0 e 45°C (a cada 5°C) não sofrem mudanças na presença de 5 mol% de MT. Já a sonda 5-doxyl-PC é sensível à presença da MT na bicamada (Figura 18). Nas membranas com colesterol, que podem apresentar domínios submicroscópicos líquido-ordenados, há um ligeiro aumento nos valores da CAH medida com 5-doxyl-PC, assim como na presença da ceramida, que forma pequenos domínios na fase gel separados dos outros lipídios. Com essa sonda, verificamos que o acréscimo de MT produz aumento nos valores da constante de acoplamento hiperfino nas membranas com colesterol e ceramida, indicando aumento da rigidez local no ambiente da sonda 5-doxyl-PC.

Figura 18: Constante de acoplamento hiperfino da sonda 5-doxyl-PC 2,5 mol% em LUVs de POPC puro (*quadrados pretos*), POPC/Col 9:1 (*círculos vermelhos*) e POPC/Col/Cer 8:1:1 (*triângulos verdes*), na ausência (*sólidos*) e na presença (*abertos*) de MT, obtidas desde 25°C até 50°C.

3.1.4. Espectroscopia de fluorescência das LUVs

As LUVs são inadequadas para utilização na microscopia, já que possuem diâmetro da ordem de 100 nm, menor que a resolução do microscópio, que é da ordem de 500 nm. Com esses modelos de membrana é possível realizar as medidas tradicionais de espectroscopia de fluorescência, tanto de estado estacionário como resolvidas no tempo, além de medidas de FCS, que permitem medir a difusão das LUVs como um todo. As sondas fluorescentes são escolhidas de acordo com o que se deseja observar e com a partição da mesma nas diferentes fases lipídicas (95, 119).

Análogos de lipídios marcados com NBD apresentam tempo de vida mais longo quando incorporados na membrana. Especificamente a sonda C6-NBD-PC apresenta tempos longos de 12 ns em domínios líquido-ordenados e 7 ns em domínios líquido-desordenados.

Primeiramente foram estudadas LUVs de fosfolipídios puros, DMPC e DPPC, abaixo e acima da temperatura de transição de cada um deles, 23°C e 41°C, respectivamente. As sondas NBD-lipídios foram utilizadas na razão de 1 mol%. A sonda NBD-PE com marcação no grupo cabeça polar se localiza na região polar da bicamada (120). Em vesículas de DPPC na fase fluida, o grupo NBD na sonda C6-NBD-PC se localiza na região do grupo glicerol e se curva para uma posição transversa próxima à interface (76). Abaixo da temperatura de transição de fase, o grupo NBD em NBD-PC pode se localizar em regiões mais profundas da bicamada, com uma distribuição ao longo do eixo da membrana (121).

Na ausência de MT os perfis de decaimento da intensidade dos NBD-lipídios em LUVs de DMPC e DPPC são ajustados por biexponenciais, dominadas por um tempo de vida longo com fator pré-exponencial de 0,60 (Tabela 3). Os valores do tempo de vida longo estão em torno de 10 ns a 15 °C e diminuem para valores entre 6,0 e 8,0 ns acima da temperatura de transição. O tempo de vida curto (entre 2,0 e 4,0 ns) contribui menos com o decaimento, com fator pré-exponencial menor que 0,4 (Tabela 3). O decaimento é mais rápido em temperaturas acima da transição de fase, como pode ser observado pelos tempos de vida médios (Tabela 3). Como já observado anteriormente na literatura (121), os tempos de vida de fluorescência da sonda NBD-PE são mais afetados pelas mudanças térmicas nas vesículas de DPPC que o C6-NBD-PC, e aqui foram observados efeitos similares para vesículas de DMPC.

Tabela 3 – Parâmetros do ajuste biexponencial do decaimento da intensidade de fluorescência (tempo de vida τ_i , fator pré-exponencial normalizado α_i e tempo de vida médio τ_m) das sondas NBD-lipídios 5 μ M em LUVs de DMPC e DPPC 1 mM, em PBS, pH 7,4 sem MT e com 100 μ M de MT (10 mol%), nas fases gel (15 °C) e fluida (35 °C para o DMPC e 55 °C para DPPC). $\lambda_{exc} = 465$ nm, $\lambda_{em} = 530$ nm.

Lipídio	Sonda	T	[MT] (μ M)	τ_1 (ns)	α_1	τ_2 (ns)	α_2	τ_m (ns)
DMPC	NBD-PE	15 °C	0	11.6	0.74	3.7	0.26	10.8
			100	10.4	0.65	3.7	0.35	9.3
		35 °C	0	8.5	0.81	2.1	0.19	8.2
			100	8.0	0.81	1.6	0.19	7.7
	C6-NBD-PC	15 °C	0	10.2	0.71	1.8	0.29	8.2
			100	8.4	0.63	2.0	0.37	7.7
		35 °C	0	7.8	0.99	0.1	0.01	7.8
			100	7.4	0.82	0.8	0.18	7.3
DPPC	NBD-PE	15 °C	0	11.6	0.59	3.8	0.41	10.2
			100	11.6	0.51	4.2	0.49	9.7
		55 °C	0	6.2	0.81	1.8	0.19	5.7
			100	6.1	0.81	1.8	0.19	5.8
	C6-NBD-PC	15 °C	0	9.3	0.61	2.8	0.39	8.2
			100	8.1	0.59	3.0	0.41	7.1
		55 °C	0	6.4	0.80	3.1	0.20	6.0
			100	5.7	0.86	1.9	0.14	5.5

desvios = 2%

Figura 19: (a) Tempos de vida, τ_1 e (b) fatores pré-exponenciais, α_1 , obtidos a partir do ajuste biexponencial (τ_1 , α_1 *quadrados* e τ_2 , α_2 *círculos*) dos perfis de decaimento da intensidade de fluorescência da sonda NBD-PE 1 mol% em LUVs de DMPC 1 mM a 15°C (*sólido*) e 35°C (*aberto*). $\lambda_{exc} = 460$ nm, $\lambda_{em} = 530$ nm.

Figura 20: Efeito da MT no decaimento da sonda NBD-PE (5 μ M) em LUVs de DMPC 1 mM (*aberto*) e da sonda C6-NBD-PC em LUVs de DPPC 1 mM (*sólido*). Gráficos, em função da concentração de MT, da razão entre o tempo médio com adição de MT e o valor inicial sem MT. Temperaturas abaixo (15°C) (*quadrados*) e acima a transição de fase lipídica (35°C para DMPC e 55°C para DPPC) (*círculos*).

Apesar de os tempos de vida não permitirem uma distinção clara das modificações provocadas nas bicamadas pela adição de MT (Figura 19a), o fator pré-exponencial revela claramente a variação na distribuição das sondas entre as duas populações nas vesículas que ocorre quando a MT é adicionada acima da CMC (50 μ M) (Figura 19b). Como o cálculo do tempo de vida médio incorpora as contribuições de ambos, os tempos de vida e os fatores pré-exponenciais (Equação (10)), esse parâmetro fornece uma melhor descrição dos efeitos promovidos pela MT nas vesículas de DMPC e DPPC (Figura 20). A taxa de diminuição nos tempos de vida médios (observada pela inclinação do gráfico na Figura 20) devido à incorporação da MT na bicamada é maior nos passos iniciais de adição de MT e sofre uma ligeira diminuição em concentração de MT próximas à CMC em solução tampão. Portanto, os dados com resolução temporal indicam que a adição do fármaco afeta gradualmente o ambiente em torno da sonda fluorescente, e o aumento da desordem promovido pela MT diminui ambos os tempos de vida, o longo e o curto. Na CMC, a MT pode afetar a bicamada em uma maior extensão, o que se reflete na variação na distribuição das populações da sonda na bicamada. Entretanto, acima da CMC as variações no ambiente ao redor da sonda são menos afetadas pela adição de MT, com menor influência nos processos de desexcitação da sonda fluorescente. É notável que as variações são mais pronunciadas quando os lipídios na vesícula estão na fase gel (baixas temperaturas) do que quando estão na fase fluida (altas temperaturas). Isso é esperado já que a estrutura da bicamada acima da temperatura de transição de fase já se encontra em um estado menos ordenado reduzindo o efeito geral de desordenamento promovido pela MT.

Considerando os resultados das sondas NBD-PE e C6-NBD-PC em LUVs de DMPC e DPPC, pode-se propor que a adição da MT em concentrações abaixo da CMC tem um efeito de desordenamento na bicamada, e acima da CMC, mudanças drásticas ocorrem, causando formação de agregados de lipídios e MT, com rompimento da membrana.

Em seguida foram estudadas LUVs de POPC, que se encontram na fase fluida a temperatura ambiente. Quando é adicionado colesterol no sistema, não são observadas mudanças significativas nas posições espectrais de absorção e emissão das sondas NBD-lipídios (dados não apresentados). Foram então realizados experimentos de espectroscopia resolvida no tempo, a partir dos quais foram obtidos decaimentos da intensidade de fluorescência das sondas. As curvas biexponenciais resultaram em dois tempos de vida de fluorescência, apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros dos ajustes biexponenciais das curvas de decaimento da intensidade de fluorescência de LUVs de POPC e POPC/Col 5:1 marcadas com as sondas NBD-lipídios 0,5 mol%. τ_i são os tempos de vida de fluorescência com suas respectivas incertezas do ajuste, α_i são os fatores pré-exponenciais normalizados, e τ_m é o tempo de vida médio calculado a partir desses valores.

Composição lipídica	Sonda	α_1	τ_1 (ns)	α_2	τ_2 (ns)	τ_m (ns)
POPC	NBD-PE	0,110	$2,62 \pm 0,19$	0,890	$8,93 \pm 0,04$	9,37
POPC/Col 5:1		0,136	$3,00 \pm 0,19$	0,864	$9,43 \pm 0,06$	10,20
POPC	C6-NBD-PC	0,463	$1,72 \pm 0,02$	0,537	$4,19 \pm 0,01$	4,46
POPC/Col 5:1		0,434	$1,66 \pm 0,02$	0,566	$5,08 \pm 0,02$	5,26
POPC	C12-NBD-PC	0,108	$1,63 \pm 0,11$	0,891	$6,58 \pm 0,02$	6,68
POPC/Col 5:1		0,156	$2,07 \pm 0,10$	0,844	$6,77 \pm 0,02$	7,08

Observa-se que na presença de colesterol na membrana, os valores de tempo de vida das três sondas NBD-lipídios aumentam. A sonda mais afetada pela adição de colesterol é o C6-NBD-PC. Posteriormente, esse resultado foi considerado para a escolha dessa sonda no estudo de GUVs por FLIM. Para a sonda C6-NBD-PC, tempos mais longos da ordem de 7 ns são esperados em fase líquido desordenada, enquanto na fase líquido ordenada, são esperados tempos da ordem de 12 ns (104). Medidas de FRET em LUVs formadas pela mistura POPC/PSM/Col 4:2:4 (PSM: esfingomielina), mostram a coexistência de domínios submicroscópicos sem segregação lipídica lateral na escala de μm . O colesterol provoca um aumento no ordenamento lipídico, provocando um aumento no tempo de vida (40). Apesar de o valor do tempo de vida ser ainda menor que 7 ns, provavelmente devido a uma maior concentração dessa sonda e autossupressão por agregação, observa-se a tendência de aumento na presença de colesterol, o que indica um maior ordenamento da bicamada provocado por esse lipídio.

A mistura de FLs POPC/DPPC 1:1 foi também estudada utilizando as três sondas NBD-lipídios, e o efeito da miltefosina foi analisado a partir de valores de tempo de vida de fluorescência. Foram realizados experimentos com adição de MT de 20 em 20 μM até 100 μM (Tabela 5).

Tabela 5 – Valores de tempo de vida das sondas NBD-lipídios 0,5 mol% em sistema de LUVs de POPC/DPPC 1:1 e efeito da adição de MT em concentrações de 20 até 100 μM .

Sonda	[MT] (μM)					
	0	20	40	60	80	100
NBD-PE	10,8	10,5	10,4	10,4	10,2	10,1
	3,0	2,9	2,9	2,8	2,9	2,9
C6-NBD-PC	10,4	10,3	9,9	9,9	9,8	9,6
	2,9	2,6	2,3	2,5	2,4	2,4
C12-NBD-PC	7,3	7,3	7,2	7,2	7,1	7,0
	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2

Incerteza no ajuste = $\pm 0,1$

Uma observação que pode ser feita comparando os dados da Tabela 4 e da coluna sem MT da Tabela 5 é que os valores para POPC puro são menores que para aqueles para as vesículas de POPC/DPPC 1:1, e essa composição de dois FLs tem valores de tempo de vida ainda maiores que aqueles obtidos na composição POPC/Col 5:1. Isso indica que o efeito de enrijecimento da membrana de POPC provocado pela presença de 50 mol% de DPPC é maior que para 17 mol% de colesterol.

Os valores do tempo de vida mais longo (Figura 21) diminuem com o acréscimo de MT. A partir desses dados é possível concluir que o efeito do fármaco nas bicamadas de POPC/DPPC 1:1 é oposto ao efeito do colesterol. Além do conhecimento do efeito no tempo de vida da sonda C6-NBD-PC, que é menor com um maior grau de ordenamento, sabe-se que o colesterol aumenta a rigidez da bicamada, levando à conclusão de que a miltefosina aumenta a fluidez da bicamada.

Figura 21: Valores do tempo de vida mais longo das sondas NBD-PE (*preto*), C6-NBD-PC (*vermelho*), e C12-NBD-PC (*azul*) 0,5 mol% em sistema de LUVs de POPC/DPPC 1:1 em função da concentração de MT.

3.1.5. Ensaio de ditionito

Para o ensaio de ditionito foi utilizada a sonda NBD-PE 0,5 mol% em LUVs de POPC, POPC/Col 9:1 e POPC/Cer/Col 8:1:1, na ausência e na presença de 5 mol% de MT.

Figura 22: Curvas de cinética da intensidade de fluorescência da sonda NBD-PE 0,5 mol% em LUVs de POPC (*preto*), POPC/Col 9:1 (*vermelho*) e POPC/Cer/Col 8:1:1 (*verde*) com adição de 50 mM de ditionito de sódio aos 30 s, e 0,5 mol% de Triton X-100 aos 300 s, (a) na ausência e (b) na presença de 5 mol% de MT.

Nos gráficos da Figura 22 podemos observar a fração da sonda que não reagiu com o ditionito de sódio, na ausência e na presença de MT, para as diferentes composições lipídicas das LUVs. Calculando a fluorescência destruída pelo ditionito após um tempo infinito (platô), e a constante de taxa da reação de redução a partir da Equação (1), obtêm-se os dados da Tabela 6.

Tabela 6 – Fluorescência destruída pelo ditionito de sódio após um tempo infinito (platô), $F(\infty)$, e a constante de taxa da reação de redução, k , para a sonda NBD-PE 0,5 mol% em LUVs de POPC, POPC/Col 9:1 e POPC/Cer/Col 8:1:1 na ausência (-) e na presença (+) de 5 mol% de MT.

Composição	k^a (s ⁻¹)		$F(\infty)^b$ (%)	
Lipídica	(-) MT	(+) MT	(-) MT	(+) MT
POPC	0,030	0,031	45,7	51,0
POPC/Col	0,028	0,031	46,6	40,9
POPC/Col/Cer	0,031	0,029	46,7	50,7

^aincerteza $\pm 0,001$

^bincerteza $\pm 0,3$

As constantes de taxa não tem variação entre as composições lipídicas na ausência nem na presença de MT. Já quando analisamos a fluorescência destruída pelo ditionito de sódio, vê-se que a porcentagem aumenta na presença de 5 mol% e MT, tanto para as vesículas de POPC quanto para as de POPC/Col/Cer, indicando que a MT faz com que mais moléculas da sonda estejam acessíveis ao ditionito, mesmo com uma mesma taxa de redução. Se a membrana estivesse mais permeável, a taxa seria maior. O que ocorre é que há um maior número de moléculas de NBD na monocamada externa da membrana. Já na presença de colesterol na bicamada, o efeito é contrário, diminuindo a porcentagem de fluorescência destruída na presença de MT.

Observando a adição de MT durante o experimento (Figura 23a), nota-se que não há variação significativa nas inclinações, ou seja, nas taxas de diminuição da fluorescência nessa escala de tempo. Uma maior diferença na taxa é observada para a composição POPC/Cer/Col, e a menor para POPC/Col quando já há MT 5 mol% e é adicionado mais 5 mol% (Figura 23b). Ou seja, quando já há MT, a adição de mais MT tem maior efeito, e o tempo para observação dos efeitos é maior que o tempo do experimento.

Figura 23: Curvas de cinética da intensidade de fluorescência da sonda NBD-PE 0,5 mol% em LUVs de POPC (*preto*), POPC/Col 9:1 (*vermelho*) e POPC/Cer/Col 8:1:1 (*verde*) após a adição de ditionito de sódio aos 30 s (a) adicionando 5 e 10 mol% de MT aos 120 e 210 s e (b) na presença de 5 mol% de MT e adicionando mais 5 mol% aos 165 s.

Observando as composições separadamente (Figura 24), em POPC (a), observa-se que com MT a fluorescência já se inicia em um patamar mais baixo (*vermelho*), patamar que é atingido com a adição de MT após 90 s (*verde*). Nessas LUVs a MT interage em tempos na escala do experimento. Com colesterol (b) observa-se que a adição de MT ao longo do experimento (*verde* e *azul*) tem maior influência do que quando a preparação das LUVs é feita já na presença do fármaco. Na presença de ceramida (c), o efeito é semelhante ao em POPC puro. A bicamada é mais perturbada com a adição durante o experimento.

Figura 24: Curvas de cinética da intensidade de fluorescência da sonda NBD-PE 0,5 mol% em LUVs de (a) POPC, (b) POPC/Col 9:1 e (c) POPC/Cer/Col 8:1:1 após a adição de ditionito de sódio aos 30 s, na ausência de MT (*preto*), adicionando 5 e 10 mol% de MT aos 120 e 210 s (*verde*), na presença de 5 mol% de MT (*vermelho*), e adicionando mais 5 mol% de MT aos 165 s (*azul*).

3.1.6. Medidas de FCS

Medidas de FCS fornecem valores do coeficiente de difusão no plano da bicamada lipídica, permitindo assim a caracterização e determinação da fase lipídica da membrana ou do domínio lipídico em que a sonda está inserida. É importante fazer uma curva média de diferentes vesículas. A presença de colesterol em membranas de DLPC (1,2-dilauroyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) provoca uma diminuição no coeficiente de difusão sem surgimento de outra fase nas imagens de FLIM. Já em vesículas de DPPC, a presença de colesterol leva a membrana à fase fluida (122).

As medidas de FCS levam à obtenção de diferentes parâmetros como o coeficiente de difusão translacional, além de permitir que as medidas sejam realizadas com razões sonda/lipídios bem mais baixas, diminuindo uma possível influência da sonda na membrana. As curvas de autocorrelação devem ser ajustadas por funções de correlação adequadas (122), que além de se ajustarem melhor aos pontos medidos tenham um significado físico.

Os experimentos de FCS foram realizados com as sondas NBD-lipídios em etanol, meio em que as sondas são solúveis, e em diferentes combinações lipídicas, como DPPC e POPC puros, e POPC/DPPC 1:1 e 7:3. As funções de autocorrelação foram ajustadas a processos difusivos simples (obtendo-se um coeficiente de difusão) ou envolvendo mais de uma espécie em difusão (determinando-se dois ou mais coeficientes de difusão) (Tabela 7).

Tabela 7 - Coeficientes de difusão D_i ($\mu\text{m}^2/\text{s}$) das sondas NBD-lipídios 0,5 mol%, em etanol e em LUVs (1 mM) de diversas composições a temperatura ambiente.

Sonda \ Meio	Etanol		DPPC	POPC	POPC/DPPC 1:1		POPC/DPPC 7:3		
					D_1	D_2	D_1	D_2	D_3
NBD-PE	418,8±17,2	8,4±0,1	1,1±0,1	2,2±0,9	312±19	1,3±0,8	25,3±8,5		710±28
C6-NBD-PC	233,3±20,4	3,8±0,5	5,2±0,3	4,5±2,2	386±20	4,2±1,2			253±10
C12-NBD-PC	292,3±5,7	7,3±0,3	3,5±0,7	2,4±1,0	12,9±1,1	7,3±0,1			518±12

Verificamos que em etanol as curvas de correlação são ajustadas a processo difusivo simples, e os valores relativamente elevados dos coeficientes de difusão refletem a movimentação livre dos fluoróforos em meio homogêneo. A partir da Equação (25) é possível calcular o coeficiente de difusão de uma LUV considerando-a uma esfera com diâmetro de 100 nm. O resultado é um coeficiente de difusão de aproximadamente $4 \mu\text{m}^2/\text{s}$, compatíveis com os valores obtidos para as vesículas de um fosfolipídio, seja na fase gel

(DPPC) ou na fase fluida (POPC). Nas vesículas mistas POPC/DPPC os ajustes das curvas de correlação exigiram a presença de mais de um coeficiente de difusão, indicativo da complexidade do comportamento das sondas naquelas vesículas.

Os efeitos da miltefosina nas vesículas foram examinados com a adição de miltefosina em concentrações de até 100 μM no sistema de vesículas com mistura POPC/DPPC 7:3, com as três sondas NBD-lipídios. Os coeficientes de difusão obtidos a partir do ajuste da função de autocorrelação são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Coeficientes de difusão D_i ($\mu\text{m}^2/\text{s}$) das sondas NBD-PE, C6-NBD-PC e C12-NBD-PC 0,5 mol%, nas LUVs de POPC/DPPC 7:3 1 mM e efeito da adição de MT de 20 até 100 μM .

[MT] (μM)		0	20	40	60	80	100
Sonda							
NBD-PE	D_1	25,3 $\pm$ 8,5	---	---	---	---	---
	D_2	1,3 $\pm$ 0,8	5,4 $\pm$ 1,3	6,3 $\pm$ 3,0	6,2 $\pm$ 0,2	10,0 $\pm$ 0,8	12,5 $\pm$ 1,1
	D_3	710 $\pm$ 28	347 $\pm$ 9	319 $\pm$ 17	312 $\pm$ 12	453 $\pm$ 9	526 $\pm$ 44
C6-NBD-PC	D_1	4,2 $\pm$ 1,2	7,9 $\pm$ 1,6	6,9 $\pm$ 1,4	6,6 $\pm$ 1,2	8,8 $\pm$ 2,9	14,3 $\pm$ 0,3
	D_2	253 $\pm$ 10	391 $\pm$ 14	449 $\pm$ 17	381 $\pm$ 21	401 $\pm$ 14	633 $\pm$ 189
C12-NBD-PC	D_1	7,3 $\pm$ 0,1	3,4 $\pm$ 0,4	10,9 $\pm$ 0,2	7,2 $\pm$ 0,4	9,5 $\pm$ 1,0	8,8 $\pm$ 1,0
	D_2	518 $\pm$ 12	417 $\pm$ 19	486 $\pm$ 8	359 $\pm$ 13	366 $\pm$ 10	390 $\pm$ 16

Figura 25: Coeficientes de difusão menores das sondas NBD-PE (*preto*), C6-NBD-PC (*vermelho*) e C12-NBD-PC (*verde*), nas LUVs de POPC/DPPC 7:3 e efeito da adição de MT.

A adição de MT provoca um considerável aumento nos coeficientes de difusão lenta para as sondas NBD-PE e C6-NBD-PC, enquanto esse padrão não está claramente definido para a sonda C12-NBD-PC (Figura 25). Esse coeficiente de difusão pode estar relacionado a difusão das LUVs como um todo, e se aumentam, pode ser devido à uma diminuição das vesículas, por solubilização de partes da bicamada pelo fármaco.

Esses experimentos também foram realizados com LUVs contendo colesterol (POPC/Col 5:1), com as três sondas NBD-lipídios. Pode-se observar visualmente as diferenças entre as curvas sem miltefosina e com adição de 50 μ M do fármaco (Figura 26). Observando apenas as curvas de autocorrelação tem-se a impressão de que ocorre um aumento na difusão na presença da MT. A diferença é mais pronunciada para a sonda NBD-PE e quase não notada para a sonda C6-NBD-PC.

Figura 26: Curvas de autocorrelação normalizadas de LUVs de POPC/Col 5:1 1 mM com as sondas NBD-PE (*preto*), C6-NBD-PC (*vermelho*) e C12-NBD-PC (*verde*) 0,5 mol% na ausência (*quadrados*) e na presença de 50 μ M de MT (*círculos*).

A sonda 12-NBD-PC resultou em curvas de autocorrelação ajustáveis aos modelos disponíveis no *software* de análise utilizado (Tabela 9). Para as outras duas sondas não foram obtidos bons ajustes com os modelos disponíveis. A técnica de FCS aplicada à difusão de LUVs é pouco estudada e torna-se necessário criar novos modelos de funções para ajuste dos dados experimentais de correlação obtidos nesse sistema. Como citado anteriormente, o coeficiente de difusão de uma LUV considerada como uma esfera com diâmetro de 100 nm, é aproximadamente 4 μ m²/s. Já a difusão de sondas NBD-lipídios em bicamadas de DPPC foi calculada utilizando técnicas de dinâmica molecular pelo desvio quadrático médio dessas sondas em bicamadas fosfolipídicas (76). Esses valores são da ordem de 10 μ m²/s. Assim, os

coeficientes de difusão da tabela podem ser relacionados à difusão da LUV como um todo (D_1) e à difusão das sondas lateralmente na bicamada (D_2).

Tabela 9 - Coeficientes de difusão D_i ($\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$) da sonda C12-NBD-PC em LUVs de POPC/Col 5:1 1 mM, na ausência e na presença de MT até 50 μM , com seus respectivos coeficientes ρ_i e a porcentagem relativa de cada coeficiente P_i . Foram realizados pelo menos dois experimentos e os valores são uma média com seu respectivo desvio-padrão. O valor de n é o número de medidas consideradas nas estatísticas.

[MT] (μM)	n	ρ_1	P_1	D_1	ρ_2	P_2	D_2
0	3	0,718 $\pm$ 0,114	68,7	2,97 $\pm$ 0,62	0,327 $\pm$ 0,078	21,3	19,9 $\pm$ 1,9
10	4	0,442 $\pm$ 0,240	59,7	2,12 $\pm$ 0,70	0,298 $\pm$ 0,046	40,3	16,3 $\pm$ 6,0
20	2	0,862 $\pm$ 0,443	82,0	2,55 $\pm$ 0,36	0,189 $\pm$ 0,081	18,0	32,3 $\pm$ 12,2
30	3	0,256 $\pm$ 0,044	46,5	2,24 $\pm$ 0,79	0,295 $\pm$ 0,014	53,5	16,5 $\pm$ 0,5
40	2	0,414 $\pm$ 0,025	62,9	2,23 $\pm$ 1,00	0,244 $\pm$ 0,079	37,1	21,6 $\pm$ 4,8
50	4	0,223 $\pm$ 0,069	44,5	2,07 $\pm$ 0,59	0,278 $\pm$ 0,068	55,5	15,5 $\pm$ 3,4

Observando os valores dos coeficientes de difusão da Tabela 9, não é possível observar uma tendência nos valores, nem dos coeficientes de difusão nem dos fatores pré-exponenciais e suas respectivas porcentagens, por isso foi construído o gráfico da Figura 27.

Figura 27: Valor médio dos coeficientes de difusão D_1 (preto) e D_2 (azul) da sonda C12-NBD-PC em LUVs de POPC/Col 5:1 1 mM, na ausência e na presença de MT até 50 μM , com seu respectivo desvio-padrão para, pelo menos, duas medidas.

Ao comparar os coeficientes de difusão em função da concentração de MT (Figura 27), nota-se que, considerando os desvios, os valores permanecem praticamente constantes. Isso indica que, em vesículas de POPC contendo colesterol na proporção utilizada (17 mol%),

não é observado um efeito da MT, em concentrações até 50 μM , nos valores de coeficiente de difusão. Assim, o aumento no coeficiente de difusão das LUVs verificado em vesículas de misturas POPC/DPPC, não é observado nas vesículas de POPC com colesterol.

3.2. *Interação do análogo fluorescente MT-EtBDP com LUVs*

Como já estudado, o valor da CMC da MT é de 50 μM em tampão fosfato 10 mM pH 7,4 (117). Antes de estudar a interação do análogo MT-EtBDP e da sua utilização como sonda lipídica nas LUVs de DMPC e DPPC estudadas, foram realizados experimentos para determinar as propriedades de agregação desse composto.

Já havia sido observado que o análogo agrega em concentrações tão baixas quanto 10 μM (117). Por isso foi estudado o intervalo de concentração de até 20 μM . As medidas foram realizadas em etanol, meio em que o composto é solúvel, em tampão, para estudar a sua agregação em meio aquoso, e na presença de vesículas de DMPC, nesse caso para estudar a interação do análogo fluorescente da droga anti-*Leishmania* com um modelo mimético de membrana. As medidas foram realizadas em temperaturas abaixo (15°C) e acima (25°C, 35°C e 45°C) da temperatura de transição de fase do DMPC (21°C).

No gráfico da Figura 28 são apresentados os resultados das medidas de espectroscopia de absorção do análogo MT-EtBDP. Em etanol, meio no qual o composto é solúvel, o resultado são espectros característicos do fluoróforo BODIPY na forma monomérica, com pico em 529 nm e ombro em 502 nm, com razão entre os picos constante na faixa de concentração estudada (até 20 μM). Já em solução aquosa, esses espectros apresentam um ombro em 502 nm com maior intensidade relativa em relação ao pico principal (529 nm). Esse pico corresponde aos agregados do composto, que estão presentes desde a mais baixa concentração utilizada (4 μM), e apresentam maior absorção que o pico principal em concentrações tão baixas quanto 17,5 μM . Portanto, o análogo apresenta propriedades de agregação diferentes do fármaco original (MT), apesar de apresentar propriedade anti-*Leishmania* muito parecidas (83).

Figura 28: Espectros de absorção óptica do análogo fluorescente MT-EtBDP a 25°C em etanol em concentração de 10 e 20 μM (*preto* e *vermelho*, respectivamente), e em solução tampão fosfato 10mM (pH 7,4) em concentrações de 4, 8 12,5, 15, 17,5 e 20 μM (pico em 502 nm crescente), normalizadas pelo pico em 529 nm.

(a)

(b)

Figura 29: Espectros de fluorescência do composto MT-EtBDP a 25°C (a) em etanol e (b) em solução tampão fosfato 10mM (pH 7,4) em concentrações de 2 (*preto*), 6 (*vermelho*), 15 (*verde*), 18 (*azul escuro*) e 20 μM (*azul claro*) normalizadas pelo pico. $\lambda_{\text{exc}} = 505 \text{ nm}$.

Os espectros de fluorescência mostram um aumento na intensidade com o aumento da concentração do análogo em etanol (Figura 29a), e em tampão (Figura 29b), o aumento ocorre até 18 μM , e a partir dessa concentração ocorre diminuição na intensidade, com surgimento de um ombro em comprimentos de onda maiores. Esse efeito é devido à agregação do análogo em maiores concentrações em tampão. O efeito observado em tampão de deslocamento do pico ocorre devido ao efeito de filtro interno com aumento da absorção do análogo com o aumento da concentração.

Esses resultados são importantes, pois, no estudo da interação do análogo com membranas é necessário conhecer se o análogo se encontra na forma monomérica ou agregada.

Foi feito um estudo da interação do análogo MT-EtBDP com vesículas de DMPC, abaixo (15°C), e acima (25°C) da temperatura de transição do lipídio.

No gráfico da Figura 30 são apresentados os valores de anisotropia de fluorescência de estado estacionário. Observamos claramente uma diminuição nos valores até concentrações em torno de 8 μM , e a partir dessa concentração esses valores se tornam constantes. As medidas de anisotropia refletem o ordenamento da bicamada e sua diminuição representa um maior desordenamento, já que a mobilidade da sonda está restrita pelas cadeias dos fosfolipídios da bicamada. Observa-se também que a diminuição nos valores da anisotropia é maior em temperatura abaixo da transição, em que a bicamada está na fase gel e é mais ordenada. Como a CMC do análogo é de 8 μM , a partir desse valor, o aumento da concentração do análogo na suspensão não aumenta a quantidade de monômeros na bicamada, não alterando mais o grau de ordenamento da mesma, e, por isso, mantendo o valor de anisotropia constante. Observa-se que, em 6 μM , ainda abaixo da CMC, o valor de anisotropia abaixo da transição, é menor que o valor de anisotropia acima da transição com a menor concentração do análogo, indicando que o desordenamento local provocado pelo MT-EtBDP é maior que o desordenamento da bicamada na fase fluida.

Figura 30: Valores de anisotropia de fluorescência do composto MT-EtBDP em interação com vesículas de DMPC a 1 mM abaixo (15°C, *quadrados pretos*) e acima (25°C, *círculos vermelhos*) da temperatura de transição de fase do lipídio. Os valores são a média para 3 medidas, com seu respectivo desvio-padrão. $\lambda_{\text{exc}} = 505 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 540 \text{ nm}$.

Os dados obtidos por experimentos de anisotropia resolvida no tempo estão apresentados nos gráficos da Figura 31. A mesma tendência dos valores de anisotropia ocorre para os valores de tempo de correlação rotacional, de anisotropia inicial e residual, corroborando os resultados obtidos.

Figura 31: Dados do composto MT-EtBDP obtidos a partir das medidas de anisotropia resolvida no tempo: (a) tempo de correlação rotacional e (b) anisotropia no tempo inicial (*sólidos*) e anisotropia limite (final) (*abertos*), em interação com vesículas de DMPC a 1 mM, abaixo (15°C, *quadrados pretos*) e acima (25°C, *círculos vermelhos*) da temperatura de transição de fase do lipídio. $\lambda_{\text{exc}} = 505$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 540$ nm.

3.3. Caracterização de GUVs e interação com miltefosina

Foram feitos estudos de microscopia de fluorescência em modelos de membrana formados por diversas misturas de lipídios, incluindo misturas ternárias FLs, ELs e esteróis. As sondas fluorescentes foram escolhidas de acordo com o que se desejava observar e com a partição da mesma nas diferentes fases lipídicas (95, 119).

3.3.1. Microscopia de fluorescência e contraste de fase

Para observar os efeitos da MT em membranas, foram utilizadas GUVs, das quais foram feitas imagens de microscopia de fluorescência e contraste de fase.

Primeiramente, para observar o tipo de efeito da MT em altas concentrações nas membranas, foi feita a injeção de uma solução de alta concentração de miltefosina (3 mM) nas GUVs já no microscópio. A injeção é feita por um sistema controlado, que injeta em fluxos lentos a solução de miltefosina sobre a suspensão de GUVs depositada sobre uma lamínula de microscopia, sendo constantemente observadas e monitoradas no microscópio. Foram feitas diversas sequências de imagens das GUVs com os dois tipos de imagem (contraste de fase e fluorescência).

Figura 32: Imagens das GUVs de POPC obtidas por microscopia de contraste de fase, mostrando (a) a microseringa injetando a solução concentrada da droga miltefosina e (b)-(c) a perda de contraste quando a membrana tem sua integridade comprometida.

Figura 33: Imagens de microscopia de fluorescência da sonda DiIC₁₈ 1 mol% em GUV de POPC, antes (a) e após (b) a injeção de solução de MT 3 mM.

As figuras apresentam imagens ilustrativas das GUVs sob ação da miltefosina, não havendo, aqui, preocupação com escalas de tempo. Observando as imagens da Figura 32, pode-se observar a perda de contraste na imagem por contraste de fase, que ocorre devido à mistura das soluções interna e externa da GUV, por causa da perda da integridade da membrana. Na Figura 33, observa-se que a membrana apresenta domínios cuja formação foi provocada pela MT, agregando os lipídios da bicamada formando em diferentes regiões.

Para estudar o efeito da concentração da miltefosina nas GUVs, foram preparadas soluções de miltefosina em diferentes concentrações (100, 200, 300 e 600 μM , 1 e 3mM) nas quais foi adicionada um pequeno volume da solução de GUVs em sacarose. O tempo de cada imagem está indicado nas figuras.

Figura 34: Imagens de GUVs de POPC por microscopia por contraste de fase, em solução de MT de 0,1 mM. Imagens (a) inicial, e após (b) 10 s e (c) 64,25 s.

Na Figura 34 pode-se observar que em concentrações da ordem de 100 μM (já acima da CMC), a MT forma poros na membrana, já que, apesar da perda de contraste, pode-se observar que ainda há uma membrana esférica (Figura 34b), que perde completamente o contraste com o tempo.

Figura 35: Imagens de GUVs de POPC por microscopia por contraste de fase, em solução de MT de 0,2 mM. Imagens (a) inicial, e após (b) 0,25 s, (c) 0,5 s e (d) 13,5 s.

Na Figura 35 é possível observar o contraste totalmente perdido em uma parte da membrana (b e c), e a formação de uma nova vesícula menor em (d), mostrando que a MT solubilizou parte dos lipídios da membrana, mas a mesma se reestruturou com uma menor quantidade de lipídios formando uma nova membrana.

Figura 36: Imagens de GUVs de POPC por microscopia por contraste de fase, em solução de MT de 1 mM. Imagens (a) inicial, e após (b) 0,25 s e (c) 3 s.

Na Figura 36 observa-se que com a concentração de MT de 1 mM, o efeito de solubilização dos lipídios é maior, com perda total de contraste e formação de pequenos agregados lipídicos, destruindo completamente a membrana.

Figura 37: Imagens de GUVs de POPC por microscopia por contraste de fase, em solução de MT de 3 mM. Imagens (a) inicial, e após (b) 0,25 s e (c) 0,5 s.

Na Figura 37, observa-se que com 3 mM de MT já não foi possível encontrar GUVs grandes como em menores concentrações e a perda de contraste é rápida e ocorre a formação de um agregado de lipídios pela destruição total da membrana.

Pode-se concluir que os danos provocados às vesículas são mais drásticos com o aumento da concentração de MT, além de acontecerem em tempos cada vez menores. O efeito é de inicial formação de poros e perda de contraste, solubilização de parte da bicamada e diminuição do tamanho das vesículas, solubilização total da bicamada e destruição da membrana.

Adicionalmente, para estudar o efeito do colesterol nas membranas, foram preparadas GUVs de POPC com 30 mol% de colesterol. Foram feitas imagens da injeção de uma solução de alta concentração de miltefosina (3 mM) nas GUVs já no microscópio.

Figura 38: Imagens das GUVs de POPC/Col (7:3) obtidas por microscopia de contraste de fase, mostrando (a) a microseringa injetando a solução concentrada da droga miltefosina e (b)-(c) a perda de contraste quando a membrana tem sua integridade comprometida.

As imagens da Figura 38 mostram que as GUVs perdem contraste com a adição de MT, mas ainda é possível observar vesículas menores formadas com os lipídios não-solubilizados. Na presença de colesterol na membrana a vesícula não é totalmente destruída pela ação da MT.

Figura 39: Sequência de imagens de microscopia de fluorescência da sonda DiIC₁₈ 1 mol% em GUV de POP/Col (7:3), antes (a) e durante (b) a injeção de solução de MT 3 mM. Os índices 1 e 2 indicam duas GUVs diferentes.

Como observado na Figura 39, com a presença de colesterol nas bicamadas, o efeito da MT nas GUVs é de destruição de partes da membrana por solubilização dos lipídios da bicamada, mas as vesículas são formadas novamente, em tamanhos menores, e o processo de solubilização de pequenas porções da membrana ocorre sucessivamente até a formação de agregados no limite da resolução do microscópio.

A presença de colesterol na membrana de POPC não impede a solubilização da bicamada, mas torna o efeito da MT menos destrutivo já que as vesículas continuam existindo em tamanhos menores.

3.3.2. Microscopia confocal de fluorescência

Utilizando microscopia de fluorescência é possível observar a separação de fases de misturas de lipídios. A separação de fases é observada com domínios com a presença e ausência de um único tipo de sonda fluorescente, ou com dois tipos que particionem nas diferentes fases, e o formato desses domínios (circulares ou irregulares) varia com a presença dos compostos de interesse, ou a separação de fases pode ser inexistente (123). A discriminação entre duas fases ordenadas pode ser feita considerando-se as diferentes morfologias.

Considerações qualitativas sugerem que o formato do domínio é determinado pelo equilíbrio termodinâmico entre dois fatores: a tensão linear das fronteiras do domínio e a elasticidade de flexão. Quando a tensão linear domina, há formação de domínios circulares devido à tendência de minimização do comprimento da fronteira do domínio, assim, tais domínios são atribuídos à coexistência líquido-líquido na membrana (54, 124). Em contraste, domínios sólidos ordenados têm formato dendrítico irregular (125, 126). Portanto, pode-se concluir sobre a coexistência das fases líquido-líquido e gel-líquido a partir de imagens de fluorescência, baseando-se na morfologia dos domínios (127, 128). O formato dos domínios lipídicos está relacionado com as suas propriedades físicas, e os domínios circulares são atribuídos à fase l_o , enquanto os domínios não-circulares ou dendríticos à fase s_o (124, 126, 128-130). É possível também analisar a razão entre as intensidades nas regiões ordenada e desordenada (131).

Para os experimentos de microscopia confocal de fluorescência, foram utilizadas diversas composições lipídicas:

- um único componente fosfolipídico, POPC.
- membranas de POPC/Col 7:3, proporção de esterol próxima à encontrada na membrana plasmática da *Leishmania*.
- POPC/Cer/Col, nas proporções 8:1:1 e 1:1:1, para uma aproximação ainda maior à membrana do parasita, com o conteúdo adequado de EL, e com o conteúdo real de esterol e com a mesma razão dos três lipídios, respectivamente.
- membranas de POPC/DPPC 7:3, para observar o efeito de FLs de diferentes temperaturas de transição de fase com formação de domínios na bicamada.
- POPC/DPPC/Col 1:1:1, para observar os efeitos do colesterol,
- DOPC/DPPC/Col 1:1:1, sendo essa mistura já bastante estudada e servindo de parâmetro.

Para o estudo da interação da miltefosina, foram utilizadas razões de MT/lipídios de 5 e 10 mol% na solução de lipídios na preparação das GUVs, e também foram feitos experimentos com a adição de MT, 5, 10, 20 e 50 mol% nas suspensões de GUVs. A razão na membrana não é conhecida quando a MT é adicionada na suspensão das GUVs, já que não se sabe quanto de MT se insere na bicamada, portanto a razão molar é aquela adicionada. A escolha das baixas concentrações é devido ao interesse em estudar a interação da MT com a bicamada, que já havia sido estudado por outras técnicas, inclusive microscopia de fluorescência de GUVs, a ação do fármaco em concentrações mais altas, acima de 50 mol%, e acima da sua CMC. Além disso, os estudos com a MT em células de *Leishmania* são realizados com proporções de MT/lipídios na membrana plasmática entre 0,01 e 10 mol%.

Nas imagens de microscopia confocal de fluorescência em escala de cinza, as regiões em vermelho indicam saturação do detector. As imagens foram feitas em regiões com maior concentração de GUVs para observar um maior número de GUVs e poder observar se os efeitos ocorrem em todas as GUVs ou em que proporção na amostra.

Membranas de POPC puro

Membranas de POPC se encontram na fase fluida a temperatura ambiente, e não apresentam separação de fases. Com a adição de MT em razões molares de 5 e 10 mol% não há mudança nas características da suspensão de GUVs (Figura 40a-c). Já em 20 mol% (Figura 40d) pode-se observar a formação de inúmeros agregados de lipídios, e as GUVs se tornam menores e mais numerosas. O efeito da MT em altas concentrações é de solubilização das bicamadas das vesículas e formação de pequenos agregados e vesículas menores.

Figura 40: Imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% mesclada com imagem de DIC de GUVs de POPC a) sem MT, e com adição de b) 5, c) 10 e d) 20 mol% de MT.

Membranas de POPC/Col. Efeitos do colesterol

Para a mistura binária POPC/Col com 30 mol% de colesterol, há coexistência das fases l_o e l_d a temperatura ambiente (132). Mas, como pode ser observado na Figura 41a, esses domínios não são visíveis na resolução do microscópio. Com a adição de MT nas razões de 5 e 10 mol%, não há alteração significativa nas GUVs (Figura 41b-c), mas a partir de 20 mol% de MT as GUVs diminuem de tamanho com formação de agregados. Na presença de colesterol o efeito é menos notado que nas GUVs puras de POPC (Figura 40d e Figura 41e).

Figura 41: Imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% mesclada com imagem de DIC de GUVs de POPC/Col 7:3 a) sem MT, e com adição de b) 5, c) 10, d) 20, e) 50 e f) 100 mol% de MT.

Algumas das imagens feitas em sequência para acompanhar a adição da MT são mostradas na Figura 42. Não há alterações significativas nas GUVs com adição de até 10 mol% de MT, podendo ser observada uma ligeira deformação de algumas GUVs e uma pequena diminuição no tamanho de outras.

Figura 42: Imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% mesclada com imagem de DIC de GUVs de POPC/Col 7:3 feitas a) antes da adição de MT, b) 60 s após a adição de 5 mol% e c) 60 s após a adição de 10 mol%.

Membranas de misturas ternárias POPC/Cer/Col

A mistura binária POPC/Cer apresenta a coexistência das fases gel e fluida, sendo a fase gel rica em ceramida (133). A transição de fase, que para o POPC puro ocorre na temperatura de $-3,7^{\circ}\text{C}$, na presença de ceramida apresenta dois valores, de baixa e alta temperatura, sendo a primeira correspondente ao POPC e a segunda à ceramida. Com 10 mol% do esfingolípido, esses valores são $-3,4^{\circ}\text{C}$ e $30,3^{\circ}\text{C}$, e com 30 mol%, $-3,1^{\circ}\text{C}$ e $43,5^{\circ}\text{C}$ (134). Em temperatura ambiente, os domínios de POPC se encontram na fase fluida, enquanto os domínios de ceramida se encontram na fase gel.

Na presença de colesterol, há uma transição da fase fluida para a coexistência de fases gel/líquido-ordenada, indicando que não há a coexistência das fases l_o e l_d nessa mistura ternária (134). Além disso, as temperaturas de transição para a mistura binária POPC/Cer são, a baixa da ordem de $-2,7^{\circ}\text{C}$, e a alta da ordem de $37,0^{\circ}\text{C}$, com 17 mol% de ceramida, e com a adição de 30 mol% de colesterol, esses valores se alteram para $3,2^{\circ}\text{C}$ e $23,1^{\circ}\text{C}$, respectivamente. A ceramida, mesmo em baixas concentrações, se encontra segregada lateralmente em microdomínios (135). Considerando o diagrama de fase ternário de POPC, colesterol e ceramida, uma membrana formada pela mistura POPC/Cer/Col 1:1:1 deve estar na fase fluida somente, enquanto na razão POPC/Cer/Col 8:1:1 deve apresentar a coexistência das fases fluida e gel (Figura 43) (136). A adição de colesterol provoca uma diminuição do pico de maior temperatura de fusão (correspondente aos domínios ricos em ceramida), e a transição para o pico de menor temperatura (corresponde à região da membrana rica em POPC) vai gradualmente desaparecendo com o aumento do conteúdo de colesterol (134).

Figura 43: Diagrama de fases de POPC, ceramida e colesterol, tendo destaque as regiões de fase fluida (F), e de coexistência das fases fluida e gel (F+G). Em destaque os pontos das composições POPC/Cer/Col 1:1:1 e 8:1:1. Adaptado de: (136).

POPC/Cer/Col 1:1:1

A mistura POPC/Cer/Col 1:1:1 é muito sensível a pequenas variações na concentração dos lipídios, e uma pequena diminuição na concentração de colesterol pode levar à formação de domínios na fase gel que não deveriam existir nessa mistura na fase fluida. Em algumas das preparações há domínios não-fluorescentes em várias GUVs. Na presença de MT, os domínios gel não-fluorescentes que excluem a sonda, se tornam ligeiramente fluorescentes, menores, e aparecem mais domínios em uma única vesícula. Em uma das preparações pode-se observar com a presença de 10 mol% de MT, são observados domínios, embora não surjam novos domínios com a adição de MT até 50 mol%.

Há preparações com domínios não-fluorescentes (fase gel) e geralmente um domínio por GUV. Na Figura 44, pode-se observar que sem MT, pouco mais da metade das GUVs apresentam domínios. Na presença de 5 mol% de MT, aproximadamente metade das GUVs contém domínios, com mais de um domínio por GUV. Há formação de domínios mais circulares na presença de 5 mol% de MT (Figura 45), indicando que estão na fase líquido-ordenada. Com 10 mol% de MT, praticamente não há GUVs (imagens não apresentadas).

Figura 44: Imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% mescladas com imagens de DIC de GUVs de POPC/Cer/Col 1:1:1 a) sem MT e b) com 5 mol% de MT.

Figura 45: Reconstrução tridimensional de imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% de GUVs de POPC/Col/Cer 1:1:1 a) sem MT e b) com 5 mol% de MT.

Nas sequências de imagens da Figura 46 a Figura 49 pode-se observar a dinâmica dos domínios não fluorescentes na ausência de MT e na presença de diferentes concentrações de MT. Na ausência de MT o domínio praticamente não se altera em um intervalo de 26,4 s (Figura 46). Com 5 mol% de MT novos domínios se formam e desaparecem em intervalos de tempo da mesma ordem (Figura 47). Com 10 mol% os domínios se tornam maiores e únicos, mas com uma dinâmica de tempos dessa mesma ordem (Figura 48). O mesmo ocorre com a adição de 25 mol% (Figura 49).

Figura 46: Sequência de imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% mescladas com imagens de DIC de GUVs de POPC/Col/Cer 1:1:1 sem MT. Intervalo entre as imagens de 13,2 s.

Figura 47: Sequência de imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% mescladas com imagens de DIC de GUVs de POPC/Col/Cer 1:1:1 com 5 mol% de MT. Intervalo entre as imagens de 26,3 s.

Figura 48: Sequência de imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% mescladas com imagens de DIC de GUVs de POPC/Col/Cer 1:1:1 com 10 mol% de MT. Intervalo entre as imagens de 24,3 s.

Figura 49: Sequência de imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% mescladas com imagens de DIC de GUVs de POPC/Col/Cer 1:1:1 com adição de 25 mol% de MT. Intervalo entre as imagens de 26,3 s.

Em GUVs sem separação de fases, pode-se observar ao longo da adição de MT (Figura 50), a formação de pequenos agregados (5 mol%, b), a diminuição do tamanho de GUVs (10 mol%, c), a formação de GUVs menores (20 mol%, d) e somente GUVs pequenas (50 mol%, e).

Figura 50: Imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% de GUVs de POPC/Col/Cer 1:1:1 (a) sem MT, e com adição de (b) 5, (c) 10, (d) 20 e (e) 50 mol% de MT.

Em uma das preparações em que as GUVs não apresentavam separação de fases na amostra sem MT (Figura 51a), quando na presença de 10 mol% de MT pode-se observar a

formação de domínios não-fluorescentes em mais da metade das GUVs observadas (Figura 51b-c).

Figura 51: Imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% mescladas com imagens de DIC de GUVs de POPC/Col/Cer 1:1:1 (a) sem MT, e (b) com 10 mol% de MT. (c) Reconstrução tridimensional de imagens de (b) adquiridas ao longo do eixo z.

Resumindo, para as amostras com separação de fases sem MT, a separação de fases se mantém quando a GUV é preparada na presença de MT, com mais domínios e menores, e diminuição no tamanho e número de GUVs. Quando a MT é adicionada observa-se que os domínios se tornam mais dinâmicos. Se não há separação de fases observa-se apenas formação de agregados lipídicos e diminuição do tamanho das GUVs com a adição de MT, e se a GUV é preparada na presença de 10 mol% de MT, as GUVs apresentam separação de fases, mas sendo elas líquido-ordenada e –desordenada, não havendo presença da fase gel que se caracteriza por domínios não-fluorescentes.

POPC/Cer/Col 8:1:1

A composição POPC/Cer/Col 8:1:1 deve apresentar coexistência das fases fluida e gel. Foi observada a coexistência das fases também na presença de MT.

Na Figura 52 pode-se observar a presença de domínios não-fluorescentes na maioria das GUVs da amostra, que apresentava uma pequena quantidade de vesículas. Com 5 mol% de MT não são observadas diferenças na amostra, e com 10 mol% observa-se que as GUVs são menores.

Figura 52: Imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% mescladas com imagens de DIC de GUVs de POPC/Cer/Col 8:1:1 (a) sem MT, (b) com 5 mol% e (c) com 10 mol% de MT.

Na reconstrução tridimensional (Figura 53) observam-se os domínios não-fluorescentes sem uma forma definida.

Figura 53: Reconstrução tridimensional de imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% de GUVs de POPC/Col/Cer 8:1:1 (a) sem MT e com (b) 5 e (c) 10 mol% de MT.

Na sequência de imagens na ausência de MT (Figura 54), observa-se que os domínios não se alteram num intervalo de 80 s. Com 5 mol% de MT (Figura 55), os domínios se formam e desaparecem em intervalos tão curtos quanto 40 s. Com 10 mol% (Figura 56), há vários domínios em uma mesma vesícula e eles se alteram em intervalos dessa ordem de tempo.

Figura 54: Sequência de imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% mescladas com imagens de DIC de GUVs de POPC/Col/Cer 8:1:1 sem MT. Intervalo entre as imagens de 26,3 s.

Figura 55: Sequência de imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% mescladas com imagens de DIC de GUVs de POPC/Col/Cer 8:1:1 com 5 mol % de MT. Intervalo entre as imagens de 26,3 s.

Figura 56: Sequência de imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% mescladas com imagens de DIC de GUVs de POPC/Col/Cer 8:1:1 com 10 mol% de MT. Intervalo entre as imagens de 26,3 s.

Na Figura 57 observa-se a diminuição no tamanho da GUV com a formação de agregados lipídicos e os domínios não-fluorescentes começam a apresentar pequena intensidade de fluorescência a partir da adição de 20 mol% de MT.

Figura 57: Imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% de GUVs de POPC/Col/Cer 8:1:1 (a) sem MT, e com adição de (b) 5, (c) 10, (d) 20, (e) 50 e (f) 100 mol% de MT.

Resumindo, quando preparadas na presença de MT, não há diferenças significativas na fase gel das GUVs em relação às GUVs sem MT. O que pode-se observar é uma maior dinâmica dos domínios. A adição de MT em concentrações maiores provoca a formação de agregados com pequenos pedaços da bicamada e diminuição do tamanho das GUVs, e uma transição de fase dos domínios da fase gel para a líquido-ordenada, que apresenta uma pequena intensidade de fluorescência devido à presença da sonda fluorescente antes excluída da fase gel.

Membranas de POPC/DPPC

Na mistura binária POPC/DPPC na razão 7:3 ocorre separação de fases gel/fluida a temperatura ambiente, sendo a fase gel correspondente ao DPPC e a fase fluida ao POPC (137).

Com a combinação de um fosfolípido monoinsaturado com baixa temperatura de transição de fase (em torno de -4°C), POPC, e um fosfolípido saturado com alta temperatura de transição de fase (em torno de 41°C), DPPC, a temperatura ambiente, com razão de POPC/DPPC 7:3, claramente se vê separação de fases nas imagens de microscopia confocal de fluorescência. Na presença de MT, a razão de fluorescência dos domínios líquido-desordenados em relação aos ordenados diminui.

Na Figura 58 observam-se os domínios não-fluorescentes que não se alteram em GUVs preparadas na presença de 10 mol% e MT.

Figura 58: Imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% mescladas com imagens de DIC de GUVs de POPC/DPPC 7:3 (a) sem MT e (b) com 10 mol% de MT.

Com adição de MT observa-se uma rápida diminuição das vesículas com a concentração, e algumas GUVs com domínios permanecem (Figura 59).

Figura 59: Reconstrução tridimensional de imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% de GUVs de POPC/DPPC 7:3 (a) sem MT, e com adição de (b) 5, (c) 10, (d) 20, (e) 50 e (f) 100 mol% de MT.

Na sequência de imagens da Figura 60 observa-se a formação e desaparecimento de domínios em tempos de 11,5 s sem MT. Com 5 mol% de MT (Figura 61), a escala de tempo da dinâmica dos domínios é da ordem de 30 s.

Figura 60: Sequência de imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% mescladas com imagens de DIC de GUVs de POPC/DPPC 7:3 sem MT. Intervalo entre as imagens de 11,5 s.

Figura 61: Sequência de imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% mescladas com imagens de DIC de GUVs de POPC/DPPC 7:3 com 5 mol% de MT. Intervalo entre as imagens de 65,8 s.

Os domínios não-fluorescentes não se alteram na presença de MT nessa composição fosfolipídica binária.

Membranas de misturas ternárias POPC/DPPC/Col

Na composição POPC/DPPC/Chol com razão molar 1:1:1 não há domínios líquidos com dimensões da ordem de μm (128).

Na Figura 62 observa-se GUVs sem separação de fases que diminuem de tamanho com adição de 5 e 10 mol% de MT.

Figura 62: Imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% mescladas com imagens de DIC de GUVs de POPC/DPPC/Col 1:1:1 (a) sem MT, (b) com 5 mol% e (c) com 10 mol% de MT.

Em uma das amostras (Figura 63), as GUVs preparadas na presença de 10 mol% de MT apresentaram separação de fases em uma das vesículas, com as fases líquido-ordenada e líquido-desordenada, ambas fluorescentes.

Figura 63: Reconstrução tridimensional de imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% de GUVs de POPC/DPPC/Col 1:1:1 a) sem MT, e com b) 5 e c) 10 mol% de MT.

Com adição de MT (Figura 64), observa-se com 20 mol% a formação de pequenos domínios circulares com maior intensidade de fluorescência em uma das vesículas, e pequenos domínios podem ser observados com 50 e 100 mol% de MT também.

Figura 64: Reconstrução tridimensional de imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% de GUVs de POPC/DPPC/Col 1:1:1 (a) sem MT, e com adição de (b) 5, (c) 10, (d) 20, (e) 50 e (f) 100 mol% de MT. Os destaques mostram as GUVs que apresentam domínios.

Algumas vesículas podem ter uma composição diferente da média, o que provoca a separação de fases na presença de MT, já que esse não é um comportamento observado na amostra como um todo e nem em todas as amostras estudadas.

Membranas de misturas ternárias DOPC/DPPC/Col

Em GUVs de DOPC/DPPC/Col 1:1:1, em que DOPC substitui POPC, os domínios líquidos estão presentes. A separação de fases foi observada, com presença da sonda em ambas as fases, e nenhuma variação pode ser verificada na presença de MT (Figura 65). As fases são líquido-ordenada e –desordenada, e uma melhor análise das mudanças pode ser feita pela análise do tempo de vida nessas fases a partir das imagens de FLIM.

Figura 65: Reconstrução tridimensional de imagens de microscopia confocal de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% de GUVs de DOPC/DPPC/Col 1:1:1 com (a) 5 e (b) 10 mol% de MT.

De maneira geral, as imagens obtidas, mostram GUVs típicas. Pode-se observar diversas regiões características nas membranas modelo:

1. Lipossomos homogêneos (sem separação de fase visível) na fase líquido-desordenada.
2. Lipossomos com domínios não-fluorescentes circulares ou dendríticos, na fase líquido-ordenada e gel, respectivamente.
3. Lipossomos com domínios com fluorescência menos intensa estão em fase mista.

Especificamente, para cada tipo de membrana modelo, temos:

POPC: líquido-desordenada, sem mudanças com acréscimo de miltefosina.

POPC/Col (7:3): sem domínios visíveis na faixa de micrometros, e sem mudanças com adição de miltefosina.

POPC/Cer/Col (1:1:1): observação da fase fluida e domínios na fase gel. Domínios crescem com adição de MT.

POPC/Cer/Col (8:1:1): observação da fase fluida com fases gel. Diminuição do tamanho das GUVs, fluidificação dos domínios e solubilização com MT.

POPC/DPPC (7:3): domínios líquido-ordenados e líquido-desordenados. Com MT diminui a razão desordenados/ordenados.

POPC/DPPC/Col (1:1:1): sem domínios visíveis na região de micrometros. Separação de fase com MT.

DOPC/DPPC/Col (1:1:1): separação de fases líquidas, sem mudanças com MT.

3.3.3. FLIM

Análogos de lipídios marcados com NBD apresentam tempo de vida mais longo quando incorporados na membrana. O decaimento de fluorescência do NBD em GUVs com formação de domínios lipídicos apresenta três tempos de vida, e em GUVs com misturas homogêneas, apenas dois. Especificamente a sonda C6-NBD-PC apresenta tempos longos de 12 ns em domínios líquido-ordenados e 7 ns em domínios líquido desordenados (104). O colesterol provoca um aumento no ordenamento lipídico, observado pelo aumento no tempo de vida. A partir da marcação fluorescente das diferentes fases e da preferência de fase lipídica da sonda pode-se distinguir os domínios (108). A sonda NBD-PE prefere a fase l_d .

Primeiramente foram feitas imagens de GUVs formadas com diferentes composições fosfolipídicas, e então foi adicionada MT em concentrações acima da CMC, para observar qualitativamente o efeito da miltefosina nesses modelos de membrana.

Figura 66: Imagem de FLIM da sonda C12-NBD-PC 0,02 mol% em GUVs de POPC. Imagem de uma área (a) antes e (b) após a adição de 100 μ M de MT, (c) de uma segunda área já com 100 μ M de MT e (d) após a adição de mais 100 μ M de MT, e (e) uma terceira área já com os 200 μ M de MT.

A Figura 66 mostra uma região com várias GUVs (a) e o efeito da MT nessas GUVs (b). Como não há mais GUVs no campo de visão, uma nova área é encontrada com GUVs (menos que na primeira região, pois já há 100 μ M de MT) (c), onde mais 100 μ M de MT é adicionada, desaparecendo as GUVs (d). A busca por uma mais GUVs é então fracassada, mas é possível observar, com baixa intensidade de fluorescência, a presença de sonda na superfície da lamínula.

A Figura 67 mostra o efeito de solubilização da bicamada pela MT em concentração igual à sua CMC (b), quando a membrana da GUV é destruída pela formação de pequenos agregados dos lipídios da bicamada com as micelas de MT, e o efeito de destruição total com adição de alta concentração, quando não se observa mais agregados com a resolução do microscópio confocal, mas somente fluorescência de fundo de pequenos agregados contendo sonda depositados na lamínula (c).

Figura 67: Imagem de FLIM da sonda C12-NBD-PC 0,01 mol% em GUVs de POPC, (a) antes e após a adição de (b) 50 e (c) 400 μ M de MT.

Para estudar o efeito no tempo de vida da sonda na bicamada, foi utilizado um intervalo de concentrações de MT de até 50 mol% em relação aos lipídios, que estavam em concentração de 50 nM. As imagens foram adquiridas e então a região de interesse (ROI, do inglês *region of interest*) foi selecionada para que somente os fótons originários da sonda localizada na membrana fossem utilizados para gerar a curva de decaimento da intensidade de fluorescência. A partir dessa curva, foi feito o ajuste dos tempos de vida, os quais foram fixados para o ajuste dos fatores pré-exponenciais para cada pixel da ROI. Então, é obtido o tempo de vida médio em cada pixel. A partir desses tempos pode ser construído um histograma, que dá a distribuição dos tempos calculados na imagem.

Membranas de POPC puro

Na Figura 68 estão as imagens de FLIM de GUVs de POPC sem MT e com adição de 5 e 10 mol% do fármaco. Observando apenas a escala de tempo de vida e as cores, não há variação significativa no tempo de vida com a adição de MT.

O decaimento de fluorescência obtido a partir das imagens de FLIM (Figura 69) foi ajustado com dois tempos de vida de fluorescência, sendo o tempo mais longo de aproximadamente 6,4 ns, correspondendo ao tempo da sonda C6-NBD-PC em fase fluida. Não há variação nesse tempo com a adição de MT até 10 mol% (Figura 70). A Figura 71 apresenta a distribuição dos tempos de vida médios nos pixels da ROI da imagens de FLIM, e pode-se observar que não há variação com a presença de MT.

Figura 68: Imagens de FLIM da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de POPC (a) sem MT e com (b) 5 e (c) 10 mol% de MT, com a região de interesse em evidência.

Figura 69: Decaimento da intensidade de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de POPC (*pontilhado*) e ajuste (*contínuo*) sem MT (*preto*), com 5 (*vermelho*) e 10 (*azul*) mol% de MT a partir da ROI das imagens de FLIM da Figura 68.

Figura 70: Valores dos tempos de vida mais longos obtidos a partir do ajuste biexponencial dos decaimentos da Figura 69.

Figura 71: Histogramas de tempo de vida de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de POPC sem MT (*preto*), com 5 (*vermelho*) e 10 (*azul*) mol% de MT a partir da ROI das imagens de FLIM da Figura 68.

Membranas de POPC/Col

Na presença de colesterol (POPC/Col 7:3), não é possível observar variação na cor na escala de cor referente aos tempos de vida nas imagens de FLIM com adição de até 50 mol% de MT (Figura 72).

Figura 72: Imagens de FLIM da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de POPC/Col 7:3 (a) sem MT e com adição de (b) 5, (c) 10, (d) 20 e (e) 50 mol% de MT, com a região de interesse em evidência.

Observando o tempo de vida mais longo (Figura 73a), que está em torno de 9 ns, ou seja, na média entre os 7 ns da fase líquido-desordenada e os 11 ns da fase líquido-ordenada, pode-se concluir que há coexistência das duas fases mas com formação de microdomínios com resolução submicroscópica. Além disso, comparando com o tempo de vida mais longo da bicamada de POPC puro, de 6,4 ns, esse tempo maior indica que o colesterol torna a bicamada mais ordenada.

Sobre a influência da MT nessa composição lipídica, na mesma proporção de MT utilizada nas GUVs de POPC (até 10 mol%) também não há uma tendência de alteração no tempo de vida mais longo (Figura 73a), mas para maiores concentrações de MT adicionadas, os tempos de vida diminuem ligeiramente. A diminuição no tempo de vida e alargamento na distribuição (Figura 73b) indicam uma fluidificação da bicamada, um efeito oposto ao do colesterol.

Figura 73: (a) Valores dos tempos de vida mais longos obtidos a partir do ajuste biexponencial dos decaimentos da intensidade de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de POPC/Col 7:3 e (b) histogramas de distribuição dos tempos na ROI das imagens de FLIM da Figura 72, sem MT (preto), com 5 (vermelho), 10 (azul), 20 (lilás) e 50 (verde) mol% de MT.

Membranas de POPC/Cer/Col

POPC/Cer/Col 1:1:1

O tempo de vida longo (Figura 75a) está em torno de 10,5 ns, indicando também nesse caso a coexistência das duas fases líquido-ordenada e líquido-desordenada, com formação de microdomínios com resolução submicroscópica. A adição de 10 mol% de MT, pode levar à formação de domínios, com diminuição do tempo de vida para 7 ns (fase l_d) e as GUVs sofrem uma transição da fase l_o para a coexistência das fases gel/fluida (Figura 74c). As regiões não-fluorescentes nas quais a sonda não está localizada estão na fase gel. Portanto, as GUVs com a presença de 10 mol% de MT sofrem uma transição da fase l_o na ausência de MT

(com tempo de 10,5 ns) para a coexistência das fases gel/fluida, e a fase fluida, fluorescente, tem tempo de vida da fase l_d , de 7 ns. Esse efeito pode ser observado também no histograma de distribuição de tempo de vida médio (Figura 75b) das ROI selecionadas nas GUVs da Figura 74.

Figura 74: Imagens de FLIM da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de POPC/Cer/Col 1:1:1 (a) sem e com (b) 5 e (c) 10 mol% de MT, com a região de interesse em evidência.

Figura 75: (a) Valores dos tempos de vida mais longos obtidos a partir do ajuste biexponencial dos decaimentos da intensidade de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de POPC/Cer/Col 1:1:1 e (b) histogramas de distribuição dos tempos na ROI das imagens de FLIM da Figura 74, sem MT (*preto*), com 5 (*vermelho*) e 10 (*azul*) mol% de MT.

Com adição de MT, não é possível observar a formação de domínios (Figura 76), mas até 20 mol% de MT, o tempo de vida longo diminui linearmente de 9,6 para 9,1 ns (Figura 77a). Esse valor indica a coexistência das duas fases com formação de microdomínios com resolução submicroscópica. Pode-se fazer a mesma análise que na presença de colesterol somente, mas como o tempo é um pouco mais longo, a bicamada deve estar um pouco mais ordenada. A diminuição no valor do tempo com a adição de MT indica uma fluidificação da bicamada. Esse efeito é mais acentuado do que nas membranas que não contém ceramida, que é um componente importante na membrana da *Leishmania*.

Figura 76: Imagens de FLIM da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de POPC/Cer/Col 1:1:1 (a) sem MT e com adição de (b) 5, (c) 10 e (d) 20 mol% de MT, com a região de interesse em evidência.

Figura 77: (a) Valores dos tempos de vida mais longos obtidos a partir do ajuste biexponencial dos decaimentos da intensidade de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de POPC/Cer/Col 1:1:1 e (b) histogramas de distribuição dos tempos na ROI das imagens de FLIM da Figura 76, sem MT (*preto*), com 5 (*vermelho*), 10 (*azul*) e 20 (*lilás*) mol% de MT.

O efeito de diminuição do tempo é mais pronunciado nas GUVs preparadas na presença da MT do que quando a MT é adicionada.

POPC/Cer/Col 8:1:1

Na presença de ceramida na proporção POPC/Col/Cer 8:1:1, observa-se a formação de domínios não fluorescentes na Figura 78. O tempo de vida longo (Figura 81a), em torno de 8 ns na ausência de MT, é próprio da fase líquido-desordenada, contendo essencialmente POPC, com pequenas quantidades de colesterol. Na presença de 5 e 10 mol% de MT não há uma tendência de alteração do tempo de vida longo.

Figura 78: Imagens de FLIM da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de POPC/Cer/Col 8:1:1 (a) sem e com (b) 5 e (c) 10 mol% de MT, com a região de interesse em evidência.

Figura 79: (a) Valores dos tempos de vida mais longos obtidos a partir do ajuste biexponencial dos decaimentos da intensidade de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de POPC/Cer/Col 8:1:1 e (b) histogramas de distribuição dos tempos na ROI das imagens de FLIM da Figura 78, sem MT (*preto*), com 5 (*vermelho*) e 10 (*azul*) mol% de MT.

Com adição de MT em uma amostra inicialmente sem domínios (Figura 80), o tempo de vida longo diminui ligeiramente de 7,85 para 7,65 ns com 20 mol% de MT (Figura 81a), indicando uma fluidificação da bicamada. Esse efeito é menos pronunciado que em POPC/Col/Cer 1:1:1, que contém maior teor de ceramida (33 mol%). Ou seja, o efeito de fluidificação é mais pronunciado em membranas mais ordenadas e com maior presença de ceramida.

Figura 80: Imagens de FLIM da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de POPC/Cer/Col 8:1:1 (a) sem MT e com adição de (b) 5, (c) 10 e (d) 20 mol% de MT, com a região de interesse em evidência.

Figura 81: (a) Valores dos tempos de vida mais longos obtidos a partir do ajuste biexponencial dos decaimentos da intensidade de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de POPC/Cer/Col 8:1:1 e (b) histogramas de distribuição dos tempos na ROI das imagens de FLIM da Figura 80, sem MT (*preto*), com 5 (*vermelho*), 10 (*azul*) e 20 (*lilás*) mol% de MT.

Membranas de POPC/DPPC

Observa-se as GUVs com domínios não-fluorescentes na Figura 82, sem MT e com 10 mol% de MT. O tempo de vida longo está em torno de 8 ns, e não varia com adição de 10 mol%, como pode-se observar nos histogramas da Figura 83. Esse valor de tempo equivale a uma fase líquido-desordenada, com maior quantidade de moléculas de POPC, fase onde a sonda particiona preferencialmente.

Figura 82: Imagens de FLIM da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de POPC/DPPC 7:3 (a) sem MT e (b) com 10 mol% de MT, com a região de interesse em evidência.

Figura 83: Histogramas de distribuição dos tempos na ROI das imagens de FLIM da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de POPC/DPPC 7:3 da Figura 82, sem MT (*preto*), e com 10 mol% de MT (*azul*).

Membranas de POPC/DPPC/Col

Para a composição POPC/DPPC/Col 1:1:1 não se observam domínios nas imagens (Figura 84). O tempo de vida longo é da ordem de 11,5 ns, e não há tendência de mudança no seu valor em GUVs preparadas na presença de 5 e 10 mol% de MT (Figura 85a).

Figura 84: Imagens de FLIM da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de POPC/DPPC/Col 1:1:1 (a) sem e com (b) 5 e (c) 10 mol% de MT, com a região de interesse em evidência.

Figura 85: (a) Valores dos tempos de vida mais longos obtidos a partir do ajuste biexponencial dos decaimentos da intensidade de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de POPC/DPPC/Col 1:1:1 e (b) histogramas de distribuição dos tempos na ROI das imagens de FLIM da Figura 84, sem MT (*preto*), com 5 (*vermelho*) e 10 (*azul*) mol% de MT.

Com adição de MT até 50 mol% não se observa separação de fases (Figura 86), mas pode-se observar uma tendência de diminuição do tempo de vida longo (Figura 87a), de 11,3 ns para 10,9 ns. Esse valor de tempo equivale a uma fase líquido-ordenada, que sofre uma fluidificação com a adição de MT.

Figura 86: Imagens de FLIM da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de POPC/DPPC/Col 1:1:1 com adição de (a) 5, (b) 10, (c) 20 e (d) 50 mol% de MT, com a região de interesse em evidência.

Figura 87: (a) Valores dos tempos de vida mais longos obtidos a partir do ajuste biexponencial dos decaimentos da intensidade de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de POPC/DPPC/Col 1:1:1 e (b) histogramas de distribuição dos tempos na ROI das imagens de FLIM da Figura 86, sem MT (*preto*), com 5 (*vermelho*), 10 (*azul*), 20 (*lilás*) e 50 (*verde*) mol% de MT.

Nas GUVs da Figura 88 observa-se a separação de fases com diferentes tempos de vida (na escala de cores, verde e vermelho) com a adição de MT. Essa separação de fase resulta em redução do tempo de vida longo de 11,8 ns sem MT para 10,4 ns com 10 mol% de MT (Figura 89a). Quando observamos os histogramas (Figura 89b), podemos observar que com 10 mol% de MT ocorre o surgimento de um segundo tempo em torno de 8 ns, além do deslocamento do pico do tempo longo de 12 ns para 10 ns, ou seja, a fase líquido-ordenada se fluidifica, e surge uma fase líquido-desordenada.

Figura 88: Imagens de FLIM da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de POPC/DPPC/Col 1:1:1 (a) sem e com (b) 5 e (c) 10 mol% de MT, com a região de interesse em evidência.

Figura 89: (a) Valores dos tempos de vida mais longos obtidos a partir do ajuste biexponencial dos decaimentos da intensidade de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de POPC/DPPC/Col 1:1:1 e (b) histogramas de distribuição dos tempos na ROI das imagens de FLIM da Figura 88, sem MT (*preto*), com 5 (*vermelho*) e 10 (*azul*) mol% de MT.

Membranas de DOPC/DPPC/Col

Para a composição de DOPC/DPPC/Col 1:1:1 observa-se a separação de fases com a escala de cores (verde e vermelho) correspondente aos tempos de vida na Figura 90.

Nos histogramas obtém-se uma distribuição de dois tempos, um da ordem de 8 ns e outro da ordem de 11 ns, na presença de 5 mol% de MT (Figura 91a). Com a adição de mais 5

e mais 15 mol% (Figura 91b-c), essa distribuição se desloca para o tempo de 8 ns, diminuindo a diferença entre as fases.

Figura 90: Imagens de FLIM da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de DOPC/DPPC/Col 1:1:1 com (a) 5 mol% e com adição de mais (b) 5 e mais (c) 10 mol% e com (d) 10 mol% de MT, com a região de interesse em evidência.

Figura 91: Histogramas de distribuição dos tempos na ROI das imagens de FLIM da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de DOPC/DPPC/Col 1:1:1 da Figura 90, com (a) 5 (*preto*), (b) 5 mais adição de 5 (*vermelho*) e (c) 5 mais adição de 15 (*azul*) mol% de MT.

Quando analisamos somente o tempo de vida longo (Figura 92) pode-se observar que o tempo com 5 mol% de MT é da ordem de 10,75 ns, e de 10 ns com 20 mol% de MT, mas a incerteza é muito grande. Por isso foi feita a análise somente das regiões com as fases líquido-ordenada e –desordenada separadamente. Para a fase l_o o tempo de vida longo está em torno de 11,8 ns (Figura 92b), como esperado, sem tendência de alteração com a concentração de MT. Já na fase l_d , o tempo é da ordem de 9 ns, sendo uma fase desordenada com um pequeno

grau de ordenamento devido à presença de colesterol, e não há tendência de alteração com a adição de MT.

Figura 92: Valores dos tempos de vida mais longos obtidos a partir do ajuste dos decaimentos da intensidade de fluorescência da sonda C6-NBD-PC 0,5 mol% em GUVs de DOPC/DPPC/Col 1:1:1 na ROI das imagens de FLIM da Figura 90. Símbolos completos com MT e abertos com MT adicionada. (a) ROI de toda a GUV, (b) ROI somente da fase líquido-ordenada e (c) ROI somente da fase líquido-desordenada.

A miltefosina tem um efeito global de diminuição das diferenças entre os limites da separação das fases, apesar de dentro das fases não ter um efeito significativo.

Capítulo 4. Conclusões

O estudo de interações do fármaco anti-*Leishmania* miltefosina com membranas foi realizado primeiramente com a utilização do análogo fluorescente MT-EtBDP em LUVs. O análogo apresenta propriedades de agregação em meio aquoso em concentrações menores que 10 μM , bem mais baixa que os 50 μM do fármaco original. Em interação com as vesículas, o análogo provoca uma diminuição no ordenamento das cadeias acila dos fosfolipídios medida por propriedades de anisotropia da sonda no sistema, sendo essa a região marcada pela sonda BODIPY, que é hidrofóbica. Mas esse efeito ocorre em concentrações tão baixas quanto a concentração de agregação do análogo, portanto ele pode ser usado como sonda na sua forma monomérica para o estudo com adição de miltefosina nas vesículas.

Estudos com as sondas NBD-lipídios em diferentes regiões da molécula de fosfolipídio foram realizados em LUVs, utilizando como parâmetro a alteração das propriedades espectroscópicas dessas sondas em diferentes composições lipídicas e com adição do fármaco estudado. As LUVs do fosfolipídio POPC apresentaram um aumento nos valores de tempo de vida com a adição de colesterol, na proporção 1:5, o qual aumenta a rigidez da bicamada. Efeitos semelhantes foram observados com a adição do fosfolipídio DPPC na proporção 3:7. Já a adição de miltefosina em proporções entre 1 e 10:100 provoca uma diminuição nos valores de tempo de vida da sonda, indicando um aumento na fluidez da bicamada. Monitorando a interação da miltefosina com vesículas de DMPC e DPPC por espectroscopia com sondas fluorescentes é possível observar uma diminuição linear no tempo de vida médio até a concentração micelar crítica do fármaco, correspondendo a razão de 5 mol% por lipídios, e acima disso, a diminuição é bem menos pronunciada. A diminuição nos valores também é mais pronunciada quando comparamos a fase gel da vesícula em relação à fase fluida, ou seja, o efeito de fluidificação da bicamada, com diminuição dos valores de tempo de vida da sonda, ocorre com maior intensidade quando a membrana se encontra abaixo da transição de fase. Os dados de anisotropia mostram um pequeno aumento acima da concentração micelar crítica, que pode estar indicando a ação do fármaco como agregado, e reflete a difusão rotacional da sonda inserida no agregado de fármaco com lipídios e não mais na bicamada.

A partir das medidas de espalhamento dinâmico de luz pode-se observar que o colesterol tem efeito de diminuição do raio das vesículas, enquanto a ceramida tem efeito de aumento, e que as vesículas de DPPC, na fase gel a temperatura ambiente, tem maior raio,

sendo que a miltefosina, na proporção de 5 mol% tem tendência de diminuir o raio das vesículas em geral.

Medidas de coeficiente de difusão por espectroscopia de correlação de fluorescência de vesículas de POPC/DPPC 7:3 indicam um aumento na difusão com a adição de miltefosina, e essa difusão das vesículas aumentada pode estar relacionada com uma diminuição no tamanho das vesículas, como foi observado nas medidas do raio das mesmas. Essa diminuição pode ser provocada pela solubilização de pequenas partes da bicamada lipídica pelos agregados do fármaco, formando vesículas menores. Em vesículas de POPC/Col 5:1 a miltefosina não provoca alteração na difusão, já que o colesterol diminui o efeito do fármaco na membrana.

Os parâmetros de espectroscopia de ressonância do spin do elétron, como constante de acoplamento hiperfino e tempo de correlação rotacional foram calculados para a sonda 16-doxyl-PC, que se localiza na região hidrofóbica da bicamada apenas em vesículas de DPPC, pois não houve nenhuma alteração nos espectros em vesículas de POPC, POPC/Col 9:1 e POPC/Col/Cer 8:1:1. Para a sonda 5-doxyl-PC não foi possível calcular o tempo de correlação rotacional por ela se localizar na região polar da bicamada e ter um movimento restrito, e não houve variação nos valores da constante de acoplamento hiperfino na presença de miltefosina. Para a sonda 16-doxyl-PC a constante de acoplamento hiperfino diminui na presença de 5 mol% de miltefosina para temperaturas abaixo da transição de fase do lipídio, indicando uma fluidificação da bicamada provocada pelo fármaco, o que não ocorre quando a bicamada já se encontra em uma fase fluida.

Utilizando o ensaio de ditonito, foi confirmada a integridade das vesículas com a presença de 5 mol% de miltefosina, e pode-se observar que a interação do fármaco com a bicamada é menor quando há colesterol, mas com ceramida, essa interação ocorre normalmente. Essa interação é maior quando as vesículas são preparadas na presença da miltefosina do que quando o fármaco é adicionado durante o experimento.

Microscopia de GUVs, tanto de fluorescência como de contraste de fase, mostraram qualitativamente a ação do fármaco na membrana com efeitos mais drásticos em altas concentrações de miltefosina. Em concentrações acima da concentração micelar crítica crescentes, é possível observar efeitos de formação de poros por perda de contraste na microscopia por contraste de fase, solubilização de porções da bicamada e formação de vesículas menores, e solubilização da membrana toda com formação de pequenos agregados lipídicos com o fármaco. Esses efeitos acontecem em tempos cada vez menores de acordo com o aumento da concentração da miltefosina e são bem menos drásticos em membranas de

POPC/Col 7:3 do que em POPC puro, tendo o colesterol um papel importante na proteção da membrana contra a interação da miltefosina.

Vesículas de diferentes composições foram analisadas por microscopia confocal. Observando domínios nas vesículas podemos concluir que a MT interage com domínios mais organizados, aumentando a fluidez dos domínios e permitindo a inserção de sondas fluorescentes.

Membranas de POPC, que se encontram na fase fluida a temperatura ambiente, não sofrem alterações na bicamada, não havendo alteração nos tempos de vida da sonda, em torno de 6,37 ns. Pode-se observar somente que a adição de miltefosina provoca a formação de pequenos agregados lipídicos e a diminuição no tamanho das vesículas.

A mistura binária POPC/Col 7:3 deve ter separação de fases líquido-desordenada/-ordenada, mas essa separação não é observada com a resolução do microscópio. A adição de miltefosina não altera as bicamadas, diminuindo ligeiramente os tempos de vida, em torno de 8,9 ns em menos de 1%, e as vesículas diminuem de tamanho, com a solubilização de partes da bicamada pela formação de agregados fármaco/lipídios a partir de 20 mol% de miltefosina. A presença de colesterol previne o efeito da miltefosina.

Na composição ternária POPC/Cer/Col 1:1:1, foram observadas algumas vesículas com separação de fases, sendo uma das fases não-fluorescente, rica em ceramida, e esse padrão não se modificou nas preparações na presença de miltefosina. Vesículas reconstruídas tridimensionalmente apresentam domínios mais circulares na presença de miltefosina, indicando uma fase líquido-ordenada e não gel, apesar de ser não-fluorescente. Os domínios se tornam mais dinâmicos com maiores concentrações de miltefosina. Os tempos de vida, da ordem de 10 ns, diminuem linearmente com adição de miltefosina para em torno de 9 ns, e chegam a 7 ns quando há separação de fases. Essas membranas são fluidificadas pela ação do fármaco.

Na composição ternária POPC/Cer/Col 8:1:1, as vesículas apresentam separação de fases, sendo a fase rica em ceramida não-fluorescente, e esse padrão não se modificou nas preparações na presença de miltefosina. Os domínios se tornam mais dinâmicos com maiores concentrações de miltefosina. Os domínios não-fluorescentes se tornam menos numerosos e ligeiramente fluorescentes com a adição do fármaco, indicando uma fase líquido-ordenada e não gel. O tempo de vida está em torno de 7,9 ns e sofre uma ligeira diminuição na presença de miltefosina. Essas membranas são fluidificadas pela ação do fármaco.

Membranas de POPC/DPPC/Col 1:1:1 ocorre separação de fases na presença de miltefosina em uma vesículas, mas esse efeito não é geral. O efeito geral é de diminuição do

tamanho das vesículas. Os tempos de vida em torno de 11,5 ns, têm uma tendência de diminuição para 10,5 ns na presença de miltefosina.

As membranas de DOPC/DPPC/Col 1:1:1 foram utilizadas como controle para observação das fases líquido-ordenada e –desordenada, com diferentes intensidades de fluorescência e tempos de vida. Essas membranas não sofrem alterações na presença da miltefosina, mas os histogramas de tempo de vida mostram que a distribuição inicial com dois tempos distintos tende a se tornar uma distribuição mais larga com um único tempo, mostrando um efeito de aproximação das fases provocado pela miltefosina.

A interação é mais evidente em membranas contendo ceramidas. As duas misturas com ceramida apresentam domínios sem fluorescência, sendo os domínios circulares com 33% de ceramida e de formato menos definido nas GUVs com 10 % de ceramida, sofrendo alterações de forma e intensidade de fluorescência com adição de miltefosina. Como os domínios lipídicos são essenciais para o funcionamento de proteínas e em processos celulares, podemos supor que a interação da miltefosina com domínios na membrana plasmática da *Leishmania* pode comprometer a vitalidade do parasita.

A interação do fármaco miltefosina com a membrana lipídica ocorre, e varia de acordo com a composição, independente do tipo de modelo (LUVs ou GUVs). A presença do fármaco na membrana é importante para que ele esteja acessível ao seu transportador, já que é sugerido que o mecanismo de morte celular provocado por ele depende da sua internalização.

Os modelos de membrana lipídicas são muito importantes no estudo de interações de fármacos com membranas, e a miltefosina tem características anfifílicas que tornam ainda mais importante seu estudo em interação com membranas lipídicas. Agora que já se conhece sua interação com componentes lipídicos importantes da membrana da *Leishmania*, um próximo passo importante é o estudo da interação do fármaco com proteínas específicas envolvidas no modo de ação da miltefosina, inseridas em membranas modelo.

Referências

1. KEALEY, A. e SMITH, R., Neglected Tropical Diseases: Infection, Modeling, and Control. **Journal of Health Care for the Poor and Underserved**, v. 21, n. 1, p. 53-69, 2010.
2. WORLD HEALTH ORGANIZATION, W. *Weekly Epidemiological Record*. 2002.
3. MISHRA, B. B., et al., Alkaloids: Future prospective to combat leishmaniasis. **Fitoterapia**, v. 80, n. 2, p. 81-90, 2009.
4. 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.
5. WORLD HEALTH ORGANIZATION, W. *Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: Second WHO report on neglected tropical diseases*. 2013.
6. WORLD HEALTH ORGANIZATION, W. *Research to support the elimination of visceral leishmaniasis*. 2008.
7. ZORZETTO, R. *Uma doença anunciada*. 2008. p. 47-51 f. Pesquisa FAPESP, ed. 151, Setembro 2008.
8. CROFT, S. L., BARRETT, M. P. e URBINA, J. A., Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 11, p. 508-512, 2005.
9. WORLD HEALTH ORGANIZATION, W. *Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010*. 2010.
10. VERMA, N. K. e DEY, C. S., Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 8, p. 3010-3015, 2004.
11. PARIS, C., BERTOGLIO, J. e BREARD, J., Lysosomal and mitochondrial pathways in miltefosine-induced apoptosis in U937 cells. **Apoptosis**, v. 12, n. 7, p. 1257-1267, 2007.
12. GRIEWANK, K., et al., Miltefosine Efficiently Eliminates *Leishmania* major Amastigotes from Infected Murine Dendritic Cells without Altering Their Immune Functions. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 652-659, 2010.
13. 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.
14. PEREZ-VICTORIA, F. J., et al., Functional cloning of the miltefosine transporter - A novel P-type phospholipid translocase from *Leishmania* involved in drug resistance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 50, p. 49965-49971, 2003.
15. SINGH, N., et al., Natural product based leads to fight against leishmaniasis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 18-45, 2014.

16. GAMARRO, F., SÁNCHEZ-CAÑETE, M. e CASTANY, S., *Mechanisms of Miltefosine Resistance in Leishmania*, in *Drug Resistance in Leishmania Parasites*, Editors A. PONTE-SUCRE, et al., 2013, Springer Vienna. p. 351-379.
17. BARRATT, G., SAINT-PIERRE-CHAZALET, M. e LOISEAU, P. M., Cellular Transport and Lipid Interactions of Miltefosine. **Current Drug Metabolism**, v. 10, n. 3, p. 247-255, 2009.
18. POMORSKI, T., et al., Tracking down lipid flippases and their biological functions. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. 6, p. 805-813, 2004.
19. DIVECHA, N. e IRVINE, R. F., Phospholipid Signaling. **Cell**, v. 80, n. 2, p. 269-278, 1995.
20. COPPOLINO, M. G., et al., Inhibition of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase I alpha impairs localized actin remodeling and suppresses phagocytosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 46, p. 43849-43857, 2002.
21. HANNUN, Y. A. e OBEID, L. M., The Ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 25847-50, 2002.
22. HANNUN, Y. A. e OBEID, L. M., Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 2, p. 139-150, 2008.
23. ZHANG, K., BANGS, J. D. e BEVERLEY, S. M., Sphingolipids in Parasitic Protozoa. **Sphingolipids as Signaling and Regulatory Molecules**, v. 688, p. 238-248, 2010.
24. BEACH, D. H., HOLZ, G. G. e ANEKWE, G. E., Lipids of Leishmania Promastigotes. **Journal of Parasitology**, v. 65, n. 2, p. 203-216, 1979.
25. ZHANG, K. e BEVERLEY, S. M., Phospholipid and sphingolipid metabolism in Leishmania. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 170, n. 2, p. 55-64, 2010.
26. RAKOTOMANGA, M., SAINT-PIERRE-CHAZALET, M. e 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.
27. YONEYAMA, K. A. G., et al., Characterization of Leishmania (Viannia) braziliensis membrane microdomains, and their role in macrophage infectivity. **Journal of Lipid Research**, v. 47, n. 10, p. 2171-2178, 2006.
28. RAKOTOMANGA, M., LOISEAU, P. M. e SAINT-PIERRE-CHAZALET, M., Hexadecylphosphocholine interaction with lipid monolayers. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes**, v. 1661, n. 2, p. 212-218, 2004.
29. SAINT-PIERRE-CHAZALET, A., et al., Membrane sterol depletion impairs miltefosine action in wild-type and miltefosine-resistant Leishmania donovani promastigotes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 5, p. 993-1001, 2009.

30. IMBERT, L., et al., Identification of phospholipid species affected by miltefosine action in *Leishmania donovani* cultures using LC-ELSD, LC-ESI/MS, and multivariate data analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, n. 3, p. 1169-1182, 2012.
31. CASTRO, B. M., et al., Edelfosine and Miltefosine Effects on Lipid Raft Properties: Membrane Biophysics in Cell Death by Antitumor Lipids. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, n. 26, p. 7929-7940, 2013.
32. TANFORD, C., *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*. 2a. ed. 1973, New York: John Wiley & Sons.
33. JONES, M. N. e CHAPMAN, D., *Micelles, Monolayers, and Biomembranes*. 1995, New York: Wiley-Liss.
34. ZANA, R., *Dynamics of surfactant self-assemblies: micelles, microemulsions, vesicles, and lyotropic phases*. Surfactant science series. Vol. 125. 2005. CRC Press.
35. BAKHT, O., et al., The phenyltetraene lysophospholipid analog PTE-ET-18-OMe as a fluorescent anisotropy probe of liquid ordered membrane domains (lipid rafts) and ceramide-rich membrane domains. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes**, v. 1768, n. 9, p. 2213-2221, 2007.
36. WANG, T. Y. e SILVIUS, J. R., Different sphingolipids show differential partitioning into sphingolipid/cholesterol-rich domains in lipid bilayers. **Biophysical Journal**, v. 79, n. 3, p. 1478-1489, 2000.
37. FIDORRA, M., et al., Lipid domains in giant unilamellar vesicles and their correspondence with equilibrium thermodynamic phases: A quantitative fluorescence microscopy imaging approach. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes**, v. 1788, n. 10, p. 2142-2149, 2009.
38. BAGATOLLI, L. A., Microscopy imaging of membrane domains. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes**, v. 1798, n. 7, p. 1285-1285, 2010.
39. SIMONS, K. e VAZ, W. L. C., Model systems, lipid rafts, and cell membranes. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 33, p. 269-295, 2004.
40. STOCKL, M. T. e HERRMANN, A., Detection of lipid domains in model and cell membranes by fluorescence lifetime imaging microscopy. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes**, v. 1798, n. 7, p. 1444-1456, 2010.
41. LINDNER, L. H., et al., Dual role of hexadecylphosphocholine (miltefosine) in thermosensitive liposomes: Active ingredient and mediator of drug release. **Journal of Controlled Release**, v. 125, n. 2, p. 112-120, 2008.
42. KLÖSGEN, B., *Conformations of Fluid Lipid Membranes*, in *Lipid Bilayers* 2001, Springer Berlin Heidelberg. p. 47-88.
43. KATSARAS, J. e RAGHUNATHAN, V. A., *Aligned Lipid—Water Systems*, in *Lipid Bilayers*. 2001, Springer Berlin Heidelberg. p. 25-45.

44. KOYNOVA, R. e CAFFREY, M., Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. **Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Biomembranes**, v. 1376, n. 1, p. 91-145, 1998.
45. SACKMANN, E. e FEDER, T., Budding, Fission and Domain Formation in Mixed Lipid Vesicles Induced by Lateral Phase-Separation and Macromolecular Condensation. **Molecular Membrane Biology**, v. 12, n. 1, p. 21-28, 1995.
46. OSTROUMOVA, O. S., et al., Effect of flavonoids on the phase separation in giant unilamellar vesicles formed from binary lipid mixtures. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 178, n. 0, p. 77-83, 2014.
47. SANKARAM, M. B. e THOMPSON, T. E., Interaction of Cholesterol with Various Glycerophospholipids and Sphingomyelin. **Biochemistry**, v. 29, n. 47, p. 10670-10675, 1990.
48. BAGATOLLI, L., et al., Two-photon fluorescence microscopy studies of bipolar tetraether giant liposomes from thermoacidophilic archaebacteria *Sulfolobus acidocaldarius*. **Biophysical Journal**, v. 79, n. 1, p. 416-425, 2000.
49. ALBERTS, B., et al., *Biologia Molecular da Célula*. 3a. ed. 1997: Artes Médicas.
50. XU, X. L., et al., Effect of the structure of natural sterols and sphingolipids on the formation of ordered sphingolipid/sterol domains (rafts). **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 36, p. 33540-33546, 2001.
51. OHVO-REKILA, H., et al., Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. **Progress in Lipid Research**, v. 41, n. 1, p. 66-97, 2002.
52. EDIDIN, M., The state of lipid rafts: From model membranes to cells. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 32, p. 257-283, 2003.
53. HECZKOVA, B. e SLOTT, J. P., Effect of anti-tumor ether lipids on ordered domains in model membranes. **Febs Letters**, v. 580, n. 10, p. 2471-2476, 2006.
54. CHIANTIA, S., et al., Effects of ceramide on liquid-ordered domains investigated by simultaneous AFM and FCS. **Biophysical Journal**, v. 90, n. 12, p. 4500-4508, 2006.
55. VEIGA, M. P., et al., Ceramides in phospholipid membranes: Effects on bilayer stability and transition to nonlamellar phases. **Biophysical Journal**, v. 76, n. 1, p. 342-350, 1999.
56. DORLO, T. P. C., et al., Pharmacokinetics of miltefosine in Old World cutaneous leishmaniasis patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 8, p. 2855-2860, 2008.
57. ALZATE, J. F., et al., Edelfosine induces an apoptotic process in *Leishmania infantum* that is regulated by the ectopic expression of Bcl-X-L and Hrk. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 10, p. 3779-3782, 2008.
58. AYRES, D. C., PINTO, L. A. e GIORGIO, S., Efficacy of Pentavalent Antimony, Amphotericin B, and Miltefosine in *Leishmania amazonensis*-Infected Macrophages Under Normoxic and Hypoxic Conditions. **Journal of Parasitology**, v. 94, n. 6, p. 1415-1417, 2008.

59. AZZOUZ, S., et al., Leishmanicidal activity of edelfosine, miltefosine and ilmofofosine. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 96, n. 1, p. 60-65, 2005.
60. BOIANI, L., et al., Furoxan-, alkylnitrate-derivatives and related compounds as anti-trypansomatid agents: Mechanism of action studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 17, p. 7900-7907, 2008.
61. BORIES, C., et al., Selection and phenotype characterisation of sitamaquine-resistant promastigotes of *Leishmania donovani*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 62, n. 3, p. 164-167, 2008.
62. CABRERA-SERRA, M. G., et al., In vitro activity of perifosine: a novel alkylphospholipid against the promastigote stage of *Leishmania* species. **Parasitology Research**, v. 100, n. 5, p. 1155-1157, 2007.
63. CALOGEROPOULOU, T., et al., Design and synthesis of potent antileishmanial cycloalkylidene-substituted ether phospholipid derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 4, p. 897-908, 2008.
64. ESCOBAR, P., et al., Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH₃ (edelfosine) and amphotericin B. **Acta Tropica**, v. 81, n. 2, p. 151-157, 2002.
65. WASSEF, M. K., FIORETTI, T. B. e DWYER, D. M., Lipid Analyses of Isolated Surface-Membranes of *Leishmania-Donovani* Promastigotes. **Lipids**, v. 20, n. 2, p. 108-115, 1985.
66. ANGELOVA, M. I., et al., Preparation of Giant Vesicles by External Ac Electric-Fields - Kinetics and Applications. **Trends in Colloid and Interface Science Vi**, v. 89, p. 127-131, 1992.
67. BERARDI, M., et al. *Aggregation Properties of a Leishmanicidal Drug and a Fluorescent Analogue*. in *VII Iberoamerican Congress of Biophysics*. 2009. Búzios, RJ, Brasil.
68. BERARDI, M. e ITO, A. S. *Análogos fluorescentes de agentes anti-parasitários: interações com agregados anfífilos*. 2010. f. Departamento de Física e Matemática, FFCLRP, Universidade de São Paulo - USP, Ribeirão Preto.
69. BERARDI, M., et al. *Antileishmanial Drug Miltefosine and a Fluorescent Analogue: Aggregation and Interaction with Vesicles*. in *XXXIII Encontro Nacional de Física da Matéria Condensada*. 2010. Águas de Lindóia, SP, Brasil.
70. ALONSO, L., et al., Interaction of miltefosine with intercellular membranes of stratum corneum and biomimetic lipid vesicles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 434, n. 1-2, p. 391-398, 2012.
71. MONTALDI, L. R., et al., End-to-end Distance Distribution in Fluorescent Derivatives of Bradykinin in Interaction with Lipid Vesicles. **Journal of Fluorescence**, v. 22, n. 4, p. 1151-1158, 2012.

72. TOVANI, C. B., et al., Comparison between cucurbiturils and beta-cyclodextrin interactions with cholesterol molecules present in Langmuir monolayers used as a biomembrane model. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v. 111, p. 398-406, 2013.
73. ROMANI, A. P., MARQUEZIN, C. A. e ITO, A. S., Fluorescence spectroscopy of small peptides interacting with microheterogeneous micelles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 383, n. 1-2, p. 154-156, 2010.
74. ROMANI, A. P. e ITO, A. S., Interaction of adrenocorticotropin peptides with microheterogeneous systems -- A fluorescence study. **Biophysical Chemistry**, v. 139, n. 2-3, p. 92-98, 2009.
75. TAKARA, M., et al., Solvent Effects in Optical Spectra of ortho-Aminobenzoic Acid Derivatives. **Journal of Fluorescence**, v. 19, n. 6, p. 1053-1060, 2009.
76. LOURA, L. M. S. e RAMALHO, J. P. P., Location and dynamics of acyl chain NBD-labeled phosphatidylcholine (NBD-PQ in DPPC bilayers. A molecular dynamics and time-resolved fluorescence anisotropy study. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes**, v. 1768, n. 3, p. 467-478, 2007.
77. LOURA, L. M. S., et al., Effects of fluorescent probe NBD-PC on the structure, dynamics and phase transition of DPPC. A molecular dynamics and differential scanning calorimetry study. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes**, v. 1778, n. 2, p. 491-501, 2008.
78. MUKHERJEE, S., et al., Organization and dynamics of N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-labeled lipids: a fluorescence approach. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 127, n. 1, p. 91-101, 2004.
79. BUNGE, A., et al., Characterization of the ternary mixture of sphingomyelin, POPC, and cholesterol: Support for an inhomogeneous lipid distribution at high temperatures. **Biophysical Journal**, v. 94, n. 7, p. 2680-2690, 2008.
80. MCGRATH, J. C., ARRIBAS, S. e DALY, C. J., Fluorescent ligands for the study of receptors. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 17, n. 11, p. 393-399, 1996.
81. MCGRATH, J. C. e 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.
82. 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.
83. 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.
84. CANTOR, C. R. e SCHIMMEL, P. R., *Biophysical Chemistry. Part II: Techniques for the study of biological structure and function*. 1980: W. H. Freeman and Company.
85. ATKINS, P., *Físico-Química*. 6a. ed. Vol. 2. 1997: LTC.

86. LAKOWICZ, J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3a. ed. 2006, Baltimore, USA: Springer.
87. MCINTYRE, J. C. e SLEIGHT, R. G., Fluorescence Assay for Phospholipid Membrane Asymmetry. **Biochemistry**, v. 30, n. 51, p. 11819-11827, 1991.
88. JOHN, K., et al., Transbilayer movement of phospholipids at the main phase transition of lipid membranes: Implications for rapid flip-flop in biological membranes. **Biophysical Journal**, v. 83, n. 6, p. 3315-3323, 2002.
89. POMORSKI, T., et al., An Improved Assay for Measuring the Transverse Redistribution of Fluorescent Phospholipids in Plasma-Membranes. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 77, n. 2, p. 139-146, 1995.
90. POMORSKI, T., et al., Transbilayer movement of fluorescent and spin-labeled phospholipids in the plasma membrane of human fibroblasts: A quantitative approach. **Journal of Cell Science**, v. 109, p. 687-698, 1996.
91. LAKOWICZ, J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 2a. ed. 1999: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
92. VALEUR, B., *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. 2002, Verlag: WILEY-VCH.
93. PICOQUANT, *MicroTime 200: An all-in-one solution for time-resolved confocal microscopy*. 2009, Berlin: United Communications.
94. HAUSTEIN, E. e SCHWILLE, P., Fluorescence correlation spectroscopy: Novel variations of an established technique. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 36, p. 151-169, 2007.
95. KORLACH, J., et al., Detection of motional heterogeneities in lipid bilayer membranes by dual probe fluorescence correlation spectroscopy. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes**, v. 1668, n. 2, p. 158-163, 2005.
96. BACIA, K., et al., Fluorescence correlation spectroscopy relates rafts in model and native membranes. **Biophysical Journal**, v. 87, n. 2, p. 1034-1043, 2004.
97. SCHERFELD, D., KAHYA, N. e SCHWILLE, P., Lipid dynamics and domain formation in model membranes composed of ternary mixtures of unsaturated and saturated phosphatidylcholines and cholesterol. **Biophysical Journal**, v. 85, n. 6, p. 3758-3768, 2003.
98. KAHYA, N., SCHERFELD, D. e SCHWILLE, P., Differential lipid packing abilities and dynamics in giant unilamellar vesicles composed of short-chain saturated glycerol-phospholipids, sphingomyelin and cholesterol. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 135, n. 2, p. 169-180, 2005.
99. KAHYA, N., et al., Lipid domain formation and dynamics in giant unilamellar vesicles explored by fluorescence correlation spectroscopy. **Journal of Structural Biology**, v. 147, n. 1, p. 77-89, 2004.

100. BACIA, K. e SCHWILLE, P., Fluorescence Correlation Spectroscopy. **Springer Protocols**, v. 398, p. 73-84, 2007.
101. GROVES, J. T., PARTHASARATHY, R. e FORSTNER, M. B., Fluorescence imaging of membrane dynamics. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 10, p. 311-338, 2008.
102. KORLACH, J., et al., Characterization of lipid bilayer phases by confocal microscopy and fluorescence correlation spectroscopy (vol 96, pg 8461, 1999). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 17, p. 9966-9966, 1999.
103. YU, T. A., MARTINEZ, M. M. e PAPPAS, D., Fluorescence Correlation Spectroscopy: A Review of Biochemical and Microfluidic Applications. **Applied Spectroscopy**, v. 65, n. 4, p. 115A-124A, 2011.
104. STOCKL, M., et al., Detection of Lipid Domains in Model and Cell Membranes by Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy of Fluorescent Lipid Analogues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 45, p. 30828-30837, 2008.
105. ZETASIZER, *PCS Theory*, 1996.
106. CANTOR, C. R. e SCHIMMEL, P. R., *Part III: The behaviour of biological macromolecules*. Biophysical Chemistry. 1980.
107. GALLA, H.-J., *Spektroskopische Methoden in der Biochemie*, ed. G. THIEME. 1988, Stuttgart: Verlag.
108. JUHASZ, J., DAVIS, J. H. e SHAROM, F. J., Fluorescent probe partitioning in giant unilamellar vesicles of 'lipid raft' mixtures. **Biochemical Journal**, v. 430, p. 415-423, 2010.
109. KORLACH, J., et al., Characterization of lipid bilayer phases by confocal microscopy and fluorescence correlation spectroscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 15, p. 8461-8466, 1999.
110. YASEEN, M., et al., The structure of zwitterionic phosphocholine surfactant monolayers. **Langmuir**, v. 22, n. 13, p. 5825-5832, 2006.
111. 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.
112. 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.
113. KANG, E. C., KATAOKA, S. e 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.
114. YASEEN, A., et al., Surface adsorption of zwitterionic surfactants: n-alkyl phosphocholines characterised by surface tensiometry and neutron reflection. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 288, n. 2, p. 361-370, 2005.

115. CHRISTOVA, Y., et al., Lipid diffusion in the plasma membrane of mouse spermatozoa: Changes during epididymal maturation, effects of pH, osmotic pressure, and knockout of the c-ros gene. **Journal of Andrology**, v. 23, n. 3, p. 384-392, 2002.
116. MARQUEZIN, C. A., et al., Spectroscopic characterization of 2-amino-N-hexadecyl-benzamide (AHBA), a new fluorescence probe for membranes. **Biophysical Chemistry**, v. 124, n. 2, p. 125-133, 2006.
117. BERARDI, M. *Análogos fluorescentes de agentes anti-parasitários: interações com agregados anfifílicos*. Dissertação de Mestrado. 2010. 139 f. Departamento de Física e Matemática, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
118. BARIONI, M. B., et al., Miltefosine and BODIPY-labeled alkylphosphocholine with leishmanicidal activity: Aggregation properties and interaction with model membranes. **Biophysical Chemistry**, v. 196, n. 0, p. 92-99, 2015.
119. BAUMGART, T., et al., Fluorescence probe partitioning between L-o/L-d phases in lipid membranes. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes**, v. 1768, n. 9, p. 2182-2194, 2007.
120. CHATTOPADHYAY, A., Chemistry and Biology of N-(7-Nitrobenz-2-Oxa-1,3-Diazol-4-Yl)-Labeled Lipids - Fluorescent-Probes of Biological and Model Membranes. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 53, n. 1, p. 1-15, 1990.
121. RAGHURAMAN, H., SHRIVASTAVA, S. e CHATTOPADHYAY, A., Monitoring the looping up of acyl chain labeled NBD lipids in membranes as a function of membrane phase state. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes**, v. 1768, n. 5, p. 1258-1267, 2007.
122. SCHWILLE, P., KORLACH, J. e WEBB, W. W., Fluorescence correlation spectroscopy with single-molecule sensitivity on cell and model membranes. **Cytometry**, v. 36, n. 3, p. 176-182, 1999.
123. OSTROUMOVA, O. S., et al., Effect of flavonoids on the phase separation in giant unilamellar vesicles formed from binary lipid mixtures. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 178, p. 77-83, 2014.
124. SAMSONOV, A. V., MIHALYOV, I. e COHEN, F. S., Characterization of cholesterol-sphingomyelin domains and their dynamics in bilayer membranes. **Biophysical Journal**, v. 81, n. 3, p. 1486-1500, 2001.
125. BAGATOLLI, L. A. e GRATTON, E., A correlation between lipid domain shape and binary phospholipid mixture composition in free standing bilayers: A two-photon fluorescence microscopy study. **Biophysical Journal**, v. 79, n. 1, p. 434-447, 2000.
126. BAGATOLLI, L. e KUMAR, P. B. S., Phase behavior of multicomponent membranes: Experimental and computational techniques. **Soft Matter**, v. 5, n. 17, p. 3234-3248, 2009.
127. MUDDANA, H. S., CHIANG, H. H. e BUTLER, P. J., Tuning membrane phase separation using nonlipid amphiphiles (vol 102, pg 489, 2012). **Biophysical Journal**, v. 103, n. 4, p. 846-846, 2012.
128. VEATCH, S. L. e KELLER, S. L., Separation of liquid phases in giant vesicles of ternary mixtures of phospholipids and cholesterol. **Biophysical Journal**, v. 85, n. 5, p. 3074-3083, 2003.

129. BAGATOLLI, L. A. e GRATTON, E., Two photon fluorescence microscopy of coexisting lipid domains in giant unilamellar vesicles of binary phospholipid mixtures. **Biophysical Journal**, v. 78, n. 1, p. 290-305, 2000.
130. MUDDANA, H. S., CHIANG, H. H. e BUTLER, P. J., Tuning Membrane Phase Separation Using Nonlipid Amphiphiles. **Biophysical Journal**, v. 102, n. 3, p. 489-497, 2012.
131. SCHEIDT, H. A., et al., Cholesterol's Aliphatic Side Chain Modulates Membrane Properties. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 52, n. 49, p. 12848-12851, 2013.
132. DE ALMEIDA, R. F. M., FEDOROV, A. e PRIETO, M., Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol phase diagram: Boundaries and composition of lipid rafts. **Biophysical Journal**, v. 85, n. 4, p. 2406-2416, 2003.
133. SILVA, L., et al., Ceramide-platform formation and -induced biophysical changes in a fluid phospholipid membrane. **Molecular Membrane Biology**, v. 23, n. 2, p. 137-U2, 2006.
134. FIDORRA, M., et al., Absence of fluid-ordered/fluid-disordered phase coexistence in ceramide/POPC mixtures containing cholesterol. **Biophysical Journal**, v. 90, n. 12, p. 4437-4451, 2006.
135. MORROW, M. R., et al., Ceramide-1-Phosphate, in Contrast to Ceramide, Is Not Segregated into Lateral Lipid Domains in Phosphatidylcholine Bilayers. **Biophysical Journal**, v. 96, n. 6, p. 2216-2226, 2009.
136. CASTRO, B. M., et al., Cholesterol-rich Fluid Membranes Solubilize Ceramide Domains IMPLICATIONS FOR THE STRUCTURE AND DYNAMICS OF MAMMALIAN INTRACELLULAR AND PLASMA MEMBRANES. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 34, p. 22978-22987, 2009.
137. SVETLOVICS, J. A., WHEATEN, S. A. e ALMEIDA, P. F., Phase Separation and Fluctuations in Mixtures of a Saturated and an Unsaturated Phospholipid. **Biophysical Journal**, v. 102, n. 11, p. 2526-2535, 2012.