UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE FÍSICA E INFORMÁTICA

LUÍS GUILHERME MANSOR BASSO

**Interações de Fármacos Anti-malária
com Modelos de Membrana**

São Carlos
2009

LUÍS GUILHERME MANSOR BASSO

**Interações de Fármacos Anti-malária
com Modelos de Membrana**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Instituto de Física de São Carlos da Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Física Básica.
Orientador: Prof. Dr. Antonio José da Costa Filho

São Carlos
2009

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 elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação IFSC/USP

Basso, Luís Guilherme Mansor

Interações de fármacos anti-malária com modelos de membrana / Luís Guilherme Mansor Basso.; orientador Antonio José da Costa Filho.-- São Carlos, 2009.
150 p.

Dissertação (Mestrado em Ciência - Área de concentração: Física Básica) – Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo.

1. RPE. 2. DSC. 3. Interação drogas-membrana. 4. Primaquina. 5. Cloroquina.

IFSC UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO
Instituto de Física de São Carlos

Caixa Postal 369
13560-970 São Carlos, SP
Av. Trabalhador São-carlense, 400
13566-590 - São Carlos, SP

Fone/Fax: (16) 3373. 9777
www.ifsc.usp.br
svposgrad@ifsc.usp.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

Luis Guilherme Mansor Basso

Dissertação apresentada ao Instituto de Física
de São Carlos da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de Concentração: Física Básica.

Aprovado em: 16/02/2009

Comissão Julgadora

Prof. Dr. Antônio José da Costa Filho

Instituição: IFSC/USP

Assinatura

Profa. Dra. Maria Teresa Moura Lamy

Instituição: IF/USP

Assinatura

Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli

Instituição: UNESP

Assinatura

Aos anônimos.

Agradecimentos

Ao professor Dr. Antonio José da Costa Filho pela orientação desde a iniciação científica, pela oportunidade dada e confiança depositada, pelo profissionalismo e pelos ensinamentos que muito contribuíram para o meu crescimento profissional.

À Profa. Dra. Rose Mary Zumstein Georgetto Naal, por ter gentilmente cedido os fármacos antimaláricos utilizados neste trabalho.

Aos professores Otaciro Rangel Nascimento e Cláudio José Magon pelas contribuições valiosas sobre física em geral e RPE em particular.

Ao Ernani Damiano Vieira pela amizade de longa data, pelo auxílio durante os experimentos e simulações, pelas discussões e pela convivência sempre alegre.

À Julia Mara Martins, pela grande amizade e por ser minha “tutora” na escalada!

Ao Dr. José Fernando de Lima, pela amizade e pelas profícuas discussões sobre simulações.

Ao Fernando Melo, pela amizade e por ter tido uma contribuição fundamental para o meu aprendizado prático dos experimentos de calorimetria.

Ao Jader, Bruno, Marcos, Rafael, Felipe, Marcela, Vinícius, Rejane, Celso, pela amizade e pelo longo convívio desde o começo da graduação.

Aos técnicos, Possato, Beto, Andressa e Bel, por toda ajuda que me deram e paciência que tiveram.

À secretária Estér, pela eficiência, paciência e por facilitar toda a burocracia.

Ao pessoal do grupo de Biofísica pelo convívio diário desde minha IC.

À Deborah Juliani Machado, uma pessoa especial em minha vida, que esteve ao meu lado desde a minha iniciação científica, me apoiando e dando suporte em todos os momentos que precisei. Te adoro menina !

E o meu agradecimento especial à minha família, pelo apoio incondicional, pelo incentivo, educação, ensinamentos, suporte e confiança.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

Ubi Dubium, Ibi libertas.

(provérbio latino)

Resumo

BASSO, L. G. M. **Interações de Fármacos Anti-Malária com Modelos de Membrana**. 2009. 150 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

Primaquina e cloroquina são agentes antimaláricos amplamente utilizados profilática e terapeuticamente contra esta enfermidade. A interação destes fármacos com sistemas modelo podem fornecer informações úteis no entendimento dos mecanismos envolvidos em sistemas biológicos reais. Neste sentido, através das técnicas de calorimetria diferencial de varredura e ressonância paramagnética eletrônica, estudamos as interações entre os fármacos antimaláricos supracitados e modelos de membrana, no intuito de investigarmos as modificações provocadas por ambos na estrutura lipídica. Os resultados obtidos indicam que a associação da cloroquina com membranas de DMPC em pH fisiológico é limitada. Uma perturbação desta molécula na estrutura e dinâmica lipídica foi detectada apenas numa região próxima ao carbono sete das cadeias acila das fosfatidilcolinas. Os experimentos de DSC mostram que este fármaco tem efeito apenas na diminuição da cooperatividade da transição principal das membranas. Por outro lado, a redução da temperatura de transição de fase lipídica observada nos estudos calorimétricos demonstra que a primaquina promove uma desestabilização da fase gel. Os experimentos de RPE corroboram esse resultado, evidenciado pelo aumento da fluidez da membrana. Adicionalmente, o aumento do empacotamento provocado no centro da bicamada lipídica sugere penetração deste fármaco até esta região. Não foram observadas alterações da estrutura e dinâmica das cadeias lipídicas na fase fluida da membrana. Os resultados obtidos fornecem um melhor entendimento

das interações fármacos-lipídios em um nível molecular, que podem ser aplicados no desenvolvimento de sistemas carreadores de ambos os fármacos.

Palavras-chave: RPE, DSC, Interação drogas-membrana, primaquina, cloroquina

Abstract

BASSO, L. G. M. **Interactions of Anti-malaria Drugs with Model Membranes**. 2009. 150 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

Primaquine (PQ) and Chloroquine (CQ) are potent therapeutic agents used in the treatment of malaria. The investigation of drug-lipid interactions is pivotal for understanding their biological activity. Electron Spin Resonance (ESR) and Differential Scanning Calorimetry (DSC) were used to investigate the effects of drug binding on the lipid phase transition and acyl chain dynamics of model membranes made up of 1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine (DMPC) phospholipids. Labels located at different positions along the lipid chain were used to monitor different membrane regions. ESR results indicated that PQ is more effective in changing the membrane structure than CQ. PQ is effective in perturbing the whole chain of DMPC vesicles, whereas the effect of CQ is more pronounced near the polar headgroup region. Furthermore, PQ causes a slight increase of the lipid packing close to the membrane center, suggesting a deeper insertion of this molecule into DMPC bilayers. DSC thermograms revealed that PQ interacts with DMPC decreasing the main transition temperature (T_M) by ca. 2°C and completely abolishing its pre-transition. On the other hand, CQ effects are mainly noticed as a decrease in the cooperativity of the main transition. Because of its lipophilic character, PQ penetrates into the bilayer hydrocarbon region causing considerable disorganization. Electrostatic interaction between CQ and the phosphatidylcholine phosphate groups is probably related with its low membrane permeability. These results shed light on the molecular mechanism of drug–lipid interaction, which may be useful for the development of lipid drug delivery systems of antimalarial drugs.

Keywords: ESR, DSC, drugs-membrane interaction, primaquine, chloroquine.

Lista de Figuras

Figura 1.	Estrutura molecular dos fármacos antimaláricos primaquina e cloroquina.	27
Figura 2.	Endoterma caracterizando um evento térmico em um biopolímero hipotético. A entalpia calorimétrica é a área sob a curva que mostra a dependência com a temperatura da capacidade calorífica da amostra à pressão constante. O ΔC_p do processo é definido na temperatura de <i>melting</i> (T_M) ou temperatura de transição de fase, onde a capacidade calorífica da amostra apresenta um máximo.	40
Figura 3.	Estrutura química do radical nitróxido.....	43
Figura 4.	(A) Estrutura do marcador de spin 5-PCSL. O grupamento nitróxido está localizado no carbono 5 da cadeia lipídica, monitorando a região próxima à cabeça polar. (B) Esquema ilustrativo dos marcadores de spin 5-PCSL intercalados com fosfolipídios em bicamadas. A linha tracejada refere-se à região mais fortemente monitorada pela sonda de spin. Figura adaptada de (80).	45
Figura 5.	(A) Diagrama de níveis representando o desdobramento Zeeman eletrônico e interação hiperfina em primeira ordem em teoria de perturbação. O spin nuclear do ^{14}N do radical nitróxido vale $I=1$. São indicadas as transições eletrônicas para um único elétron de spin $S=1/2$. (B) Primeira derivada da curva de absorção de um radical nitróxido num meio isotrópico de baixa viscosidade. Adaptada de (81).	51
Figura 6.	Representação do sistema de coordenadas do radical nitróxido.	52
Figura 7.	Anisotropia espectral de um radical nitróxido como impureza em um cristal diamagnético. Os valores principais dos elementos diagonais dos tensores são: $g_{xx} = 2,0088$, $g_{yy} = 2,0058$ e $g_{zz} = 2,0021$; $A_{xx} = 5,9$ G, $A_{yy} = 5,4$ G e $A_{zz} = 32,9$ G (82). Campo magnético externo aplicado na direção (A) x, (B) y e (C) z. Figura adaptada das referências (80 e 82).	53

Figura 8.	Definição das direções das componentes do tensor hiperfino. A forma do espectro se modifica de acordo com o ângulo θ da cadeia do marcador com a direção normal da bicamada (80).	54
Figura 9.	Anisotropia do espectro de RPE do marcador de spin sob várias condições: (A) limite rígido – rotação em torno do eixo z somente, (B) aumento na amplitude de movimento devido a inclinação e oscilação das cadeias lipídicas na bicamada, e (C) movimento isotrópico rápido (83).	55
Figura 10.	Espectros de RPE de um radical nitróxido num ambiente levemente anisotrópico apresentando as definições dos parâmetros empíricos utilizados para a análise convencional dos mesmos em dois regimes de movimento: (A) regime de movimento rápido e (B) regime de movimento lento. Estes parâmetros espectrais são utilizados na investigação da dinâmica e ordem do radical em membranas.	58
Figura 11.	Representação esquemática de alguns eixos dos sistemas de coordenadas do marcador de spin 16-PCSL em membranas lipídicas. O eixo z_d é o diretor local da membrana, z_R é o eixo de simetria da cadeia acila e, neste caso, é paralelo ao diretor local, $R_{//}$ e $R_{\perp}$ são os valores principais do tensor de difusão, θ é o ângulo de inclinação da cadeia acila relativo ao eixo z_R e está relacionado com o parâmetro de ordem e x_m , y_m e z_m são os eixos magnéticos do radical nitróxido.	64
Figura 12.	Representação esquemática de um domínio de membrana que apresenta ordenamento molecular microscópico (ampliação de uma seção da bicamada à direita), mas que, globalmente, está orientado aleatoriamente com relação ao eixo z_L do laboratório. Nesta figura também é apresentada a definição do ângulo de <i>tilt</i> Ψ , que é o ângulo entre o diretor local de cada domínio e o eixo de aplicação do campo magnético externo. (Figura adaptada das referências (80, 98)).....	67
Figura 13.	Termogramas de DSC ilustrando o efeito dos fármacos antimaláricos no comportamento termotrópico de vesículas de DMPC em tampão 50 mM Tris/HCl, pH 7,5 na ausência (inserção à direita) e na presença de 150 mM de NaCl e 5 mM de $CaCl_2$	71
Figura 14.	Transições de fase de vesículas lipídicas de DMPC. O evento 1 refere-se à chamada pré-transição, surgida da conversão da fase gel <i>tilted</i> ($L_{\beta'}$) para a fase gel <i>rippled</i> ($P_{\beta'}$) e o evento 2, denominado de transição principal, surge da conversão da fase $P_{\beta'}$ para a fase líquido-cristalino (L_{α}). Figura adaptada da referência (102) e do website da Avanti Polar Lipids (http://www.avantilipids.com/)	72
Figura 15.	Espectros de RPE do marcador de spin 5-PCSL em dispersões lipídicas de DMPC, sem e com a adição dos fármacos antimaláricos em duas diferentes temperaturas, 20 e 35°C. As linhas pontilhadas são guias para ajudar na percepção das mudanças espectrais. A seta indica uma mudança na forma da linha espectral com a adição da primaquina comparada ao espectro do lipídio puro. A largura total dos espectros é de 100 G.....	77

- Figura 16.** Dependência com a temperatura do desdobramento hiperfino máximo e do parâmetro de ordem efetivo (inserção à direita) do marcador de spin 5-PCSL incorporado em vesículas de DMPC, sem e com a adição dos fármacos antimaláricos. 79
- Figura 17.** Espectros de RPE do marcador de spin 7-PCSL em dispersões lipídicas de DMPC, sem e com a adição dos fármacos antimaláricos em duas diferentes temperaturas, 20 e 35°C. As linhas pontilhadas são guias para ajudar na percepção das mudanças espectrais. As setas indicam mudanças na forma da linha provocadas pela incorporação de ambos os fármacos. A largura total dos espectros é de 100 G. 81
- Figura 18.** Dependência com a temperatura do desdobramento hiperfino máximo e do parâmetro de ordem efetivo (inserção à direita) do marcador de spin 7-PCSL incorporado em vesículas de DMPC, sem e com a adição dos fármacos antimaláricos. 82
- Figura 19.** Espectros de RPE do marcador de spin 16-PCSL em dispersões lipídicas de DMPC, sem e com a adição dos fármacos antimaláricos em duas temperaturas, 20 e 35°C. A largura total dos espectros é de 100 G..... 84
- Figura 20.** Dependência dos parâmetros h_{+1}/h_0 e h_{-1}/h_0 (inserção, fase fluida apenas) com a temperatura do marcador de spin 16-PCSL em DMPC, sem e com a adição dos fármacos antimaláricos..... 86
- Figura 21.** Espectros de RPE dos marcadores de spin 10-, 12- e 14-PCSL na fase gel (20°C) de dispersões lipídicas de DMPC, sem e com a adição dos fármacos antimaláricos. As linhas pontilhadas representam a separação hiperfina máxima e as setas nos espectros do marcador 14-PCSL evidenciam uma segunda componente. A largura total dos espectros é de 100 G..... 87
- Figura 22.** Espectros de RPE dos marcadores de spin 10-, 12- e 14-PCSL na fase fluida (35°C) de dispersões lipídicas de DMPC, sem e com a adição dos fármacos antimaláricos. A largura total dos espectros é de 100 G..... 89
- Figura 23.** Variação do desdobramento hiperfino máximo com a temperatura dos marcadores de spin (a) 10- e (b) 12-PCSL na fase gel das vesículas de DMPC, sem e com a adição dos fármacos antimaláricos..... 90
- Figura 24.** Espectros de RPE dos marcadores de spin 5- e 7-PCSL na fase gel (20°C) inseridos em DMPC, sem e com a adição dos fármacos. As curvas em vermelho abaixo dos espectros experimentais representam os melhores ajustes obtidos a partir das simulações. A largura total dos espectros é de 100 G..... 95
- Figura 25.** Espectros de RPE dos marcadores de spin 10- e 12-PCSL na fase gel (20°C) inseridos em DMPC, sem e com a adição dos fármacos. As linhas em vermelho

abaixo dos espectros experimentais representam os melhores ajustes obtidos a partir das simulações. A largura total dos espectros é de 100 G. 97

Figura 26. Espectros de RPE dos marcadores de spin 14- e 16-PCSL na fase gel (20°C) inseridos em DMPC, sem e com a adição dos fármacos. As linhas em vermelho abaixo dos espectros experimentais representam os melhores ajustes obtidos a partir das simulações. As curvas apresentadas em azul são espectros das duas componentes encontradas com o marcador 14-PCSL. As populações de cada componente também são mostradas. A largura total dos espectros é de 100 G. 98

Figura 27. Variação do parâmetro de ordem e da mobilidade (inserção) das cadeias lipídicas na ausência e na presença dos fármacos antimaláricos monitorados pelos marcadores de spin n-PCSL (n= 5, 7, 10, 12, 14 e 16). A dinâmica rotacional foi apresentada como o logaritmo natural de $R_{\perp}$. A incerteza no valor de $R_{\perp}$ foi estimada em 5% e no valor de S_0 , em 2%. 100

Figura 28. Variação com a temperatura dos espectros de RPE do marcador de spin 14-PCSL inseridos em DMPC puro (coluna à esquerda) e na presença da primaquina (coluna central) e cloroquina (coluna à direita). Os espectros experimentais estão apresentados na cor preta e os melhores ajustes teóricos, na cor vermelha. Os números ao lado de cada espectro referem-se à temperatura na qual eles foram medidos. Largura total dos espectros: 100 G. 102

Figura 29. Espectros de RPE em três temperaturas distintas do marcador de spin 14-PCSL em DMPC na ausência (coluna à esquerda) e na presença da cloroquina (coluna à central) e da primaquina (coluna à direita). Os melhores ajustes são apresentados na cor vermelha e os espectros teóricos gerados para as duas componentes são mostrados na cor azul com as respectivas populações. Os espectros obtidos com a adição da PQ nas temperaturas de 17,2 e 18,8°C foram ajustados com uma única componente. Largura total dos espectros: 100 G. 105

Figura 30. Dependência com a temperatura do parâmetro de ordem dos marcadores de spin 14-PCSL inseridos em vesículas de DMPC na ausência e na presença dos fármacos antimaláricos. A inserção nesta figura mostra a variação do logaritmo natural de $R_{\perp}$ com a temperatura. Os parâmetros da segunda componente dos espectros também são apresentados. A incerteza no valor de $R_{\perp}$ foi estimada em 5% e no valor de S_0 , em 2%. 108

Figura 31. Variação com a temperatura dos espectros de RPE do marcador de spin 16-PCSL inseridos em DMPC puro (coluna à esquerda) e na presença da primaquina (coluna central) e cloroquina (coluna à direita). Os espectros experimentais estão apresentados na cor preta e os melhores ajustes teóricos, na cor vermelha. Os números ao lado de cada espectro referem-se à temperatura na qual eles foram medidos. Largura total dos espectros: 100 G. 110

- Figura 32.** Espectros de RPE do marcador de spin 16-PCSL em DMPC na presença da primaquina. A coluna à esquerda mostra os melhores ajustes (na cor vermelha) dos espectros experimentais com uma componente. A coluna à direita apresenta os melhores ajustes com duas componentes. Os espectros teóricos das duas componentes são mostrados na cor azul com as respectivas populações. Largura total dos espectros: 100 G. 112
- Figura 33.** Espectros de RPE do marcador de spin 16-PCSL em DMPC na ausência (coluna à esquerda) e na presença da CQ (coluna à direita). Os melhores ajustes são apresentados na cor vermelha e os espectros teóricos gerados para as duas componentes são mostrados na cor azul com as respectivas populações. Para cada temperatura, primeiramente é mostrado o ajuste com uma componente e em seguida, o ajuste com duas. Largura total dos espectros: 100 G. 114
- Figura 34.** Dependência com a temperatura do parâmetro de ordem das cadeias lipídicas monitoradas pelos marcadores de spin 16-PCSL inseridos em vesículas de DMPC na ausência e na presença dos fármacos antimaláricos. A inserção nesta figura mostra a variação do logaritmo natural de $R_{\perp}$ com a temperatura. Os parâmetros da segunda componente dos espectros com a incorporação da PQ também são apresentados. A incerteza no valor de $R_{\perp}$ foi estimada em 5% e no valor de S_0 , em 2%. 115

Lista de Tabelas

- Tabela 1.** Dados termodinâmicos obtidos da análise dos termogramas de DSC da pré-transição e da transição principal das vesículas de DMPC na ausência e na presença dos fármacos antimaláricos e em baixa e alta força iônica72
- Tabela 2.** Parâmetros magnéticos e dinâmicos obtidos por simulação com o pacote NLSL dos espectros dos marcadores n-PCSL em amostras de DMPC puro e com a incorporação dos fármacos antimaláricos medidos à 20°C96

Lista de Abreviaturas e Siglas

CQ	Difosfato de Cloroquina
DMPC	1,2-Dimiristoil-sn-Glicero-Fosfocolina
DSC	Differential Scanning Calorimetry (Calorimetria Diferencial de Varredura)
FP IX	Ferriprotoporfirina IX
GSH	Glutathione
HZ	Hemozoína
n-PCSL	1-Palmitoil-2-(n-doxil stearyl) Fosfatidilcolina (n= 5, 7, 10, 12, 14 e 16)
PQ	Disfosfato de Primaquina
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPE	Ressonância Paramagnética Eletrônica
ΔH_{cal}	Entalpia calorimétrica da transição de fase principal
ΔH_p	Entalpia calorimétrica da pré-transição
ΔH_{VH}	Entalpia de van't Hoff
ΔS	Variação de entropia da transição de fase principal na T_M

$\Delta T_{1/2}$	Largura da transição principal à meia altura
A_{MAX}	Desdobramento hiperfino máximo
A_{MIN}	Desdobramento hiperfino mínimo
h_{+1}/h_0	Razão entre as amplitudes das linhas de campo baixo e central
h_{-1}/h_0	Razão entre as amplitudes das linhas de campo alto e central
L_α	Fase lamelar líquido-cristalino
L_β'	Fase gel lamelar <i>tilted</i>
P_β'	Fase gel lamelar <i>ripple</i>
$R_{//}$	Taxa de difusão rotacional na direção paralela ao eixo z_R do sistema de coordenadas de difusão molecular
$R_\perp$	Taxa de difusão rotacional na direção perpendicular ao eixo z_R do sistema de coordenadas de difusão molecular
S_{EFF}	Parâmetro de ordem efetivo
S_0	Parâmetro de ordem
T_M	Temperatura de transição de fase principal ou temperatura de <i>melting</i>
T_P	Temperatura da pré-transição

Sumário

CAPÍTULO 1	25
INTRODUÇÃO	25
CAPÍTULO 2	33
MATERIAIS E MÉTODOS	33
2.1 Materiais	33
2.2 Preparação de Amostras.....	34
2.3 Medidas de DSC	35
2.4 Medidas de RPE.....	36
2.5 Métodos - Considerações Teóricas	37
2.5.1 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	37
2.5.2 Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) e o Radical Nitróxido	42
2.6 Análise dos Espectros de RPE	55
2.6.1 Análise Convencional: Parâmetros Empíricos	56
2.6.2 Simulações espectrais.....	60
CAPÍTULO 3	69
RESULTADOS E DISCUSSÕES	69
3.1 Análise Calorimétrica	70
3.2 Análise Convencional dos Espectros de RPE.....	75

3.2.1	Marcador de Spin 5-PCSL.....	76
3.2.2	Marcador de Spin 7-PCSL.....	80
3.2.3	Marcador de Spin 16-PCSL.....	83
3.2.4	Região Intermediária	86
3.3	Simulações Espectrais	91
3.3.1	Fase Gel	94
3.3.2	14-PCSL	101
3.3.3	16-PCSL	108
3.4	Discussão dos Resultados.....	116
CAPÍTULO 4		125
	CONCLUSÕES	125
	REFERÊNCIAS	135

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A malária é uma das doenças parasitárias mais conhecidas em todo o mundo e que maior dano já causou a milhões de pessoas nas regiões tropicais e subtropicais do globo. A estimativa é de 300 a 500 milhões de novos casos e um milhão de mortes ao ano. Conhecida popularmente como maleita, febre intermitente, paludismo, impaludismo, febre terçã ou febre quartã, esta enfermidade atualmente ainda permanece como um problema endêmico mundial constituindo, portanto, um grande problema de saúde pública. Não bastasse isso, devido à sua ampla incidência e aos efeitos debilitantes, possui grande impacto econômico ao reduzir a capacidade produtiva da população acometida.

A malária é uma doença causada por qualquer uma das quatro espécies de parasitos do gênero *Plasmodium* capazes de infectar o ser humano (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*). A transmissão normalmente ocorre quando fêmeas de mosquitos anofelinos inoculam no hospedeiro os esporozoítos, formas infectantes do parasito. O ciclo de vida do agente causador da doença é muito complexo e envolve uma fase de multiplicação sexuada no vetor (hospedeiro

definitivo) e outra assexuada no ser humano (hospedeiro intermediário) (1). Os fármacos antimaláricos utilizados profilática e terapêuticamente atuam nessas diferentes fases do ciclo de vida do parasito, agindo seletivamente em cada uma delas.

A infecção pode ser tratada através do uso dos fármacos cloroquina, mefloquina, primaquina, amodiaquina, proguanil, quinina, artemisina, entre outros (2). Contudo os parasitos têm-se tornado resistentes a muitas destas moléculas. Portanto, em algumas áreas do mundo somente poucos fármacos permanecem efetivos no tratamento da malária. No Brasil, é sabido que a resistência do *P. falciparum* à cloroquina é de 100% (3,4). Adicionalmente, Alecrim *et al.* (5) relatam casos de *P. vivax* resistente à mefloquina na região Amazônica.

Dentre os fármacos antimaláricos supracitados, a cloroquina e a primaquina exercem papel de destaque, por serem amplamente utilizadas no combate e controle da malária. As estruturas destas moléculas estão apresentadas na Figura 1. Os dois fármacos possuem uma cadeia lateral composta de átomos de nitrogênio, carbono e hidrogênio fundida à estrutura da quinolina. Este último é um composto caracterizado por uma estrutura com dois anéis, um benzeno fundido a uma piridina, anel composto por cinco carbonos com um átomo de nitrogênio, através de dois átomos de carbono. A cadeia lateral dos compostos apresenta uma pequena diferença: os dois grupos etila ligados ao grupamento amina da extremidade da cadeia da cloroquina. Além disso, ligado à quinolina, há um metil éter na primaquina e um átomo de cloro na cloroquina. Este último confere um caráter levemente polar a este fármaco comparado à primaquina. Estas diferenças estruturais são importantes para o entendimento das repostas distintas destes fármacos frente aos parasitos. Tanto a primaquina quanto a cloroquina possuem dois grupos protonáveis, portanto podem existir em três estados de ionização dependendo do pH da solução. A cloroquina exibe valores dos pK's de 8,1 para o nitrogênio quinolínico e 10,1 para a amina terciária (6). Por outro lado, os valores dos pK's dos grupos protonáveis da primaquina

são de 4,1 e 11,2 para os nitrogênios do anel quinolínico e da amina primária, respectivamente (7). Estes valores dos pK's indicam, portanto, que em condições fisiológicas, há uma predominância da forma monoprotonada da primaquina e uma mistura das formas mono- e diprotonada da cloroquina, com predominância desta última.

Figura 1. Estrutura molecular dos fármacos antimaláricos primaquina e cloroquina.

Na ausência de resistência, a cloroquina é o fármaco mais usado na profilaxia e tratamento da malária (8-10). Esse fármaco, uma 4-aminoquinolina, é altamente efetivo contra as formas eritrocíticas de *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e das cepas de *P. falciparum* sensíveis à cloroquina. Também exerce atividade contra os gametócitos das três primeiras espécies de plasmódios, mas não tem atividade contra as formas teciduais latentes de *P. vivax* e *P. ovale*. Embora tenha sido descoberto na década de 30, seu mecanismo de ação ainda não é completamente entendido (11). Com a descoberta de cepas de *P. falciparum* resistentes à cloroquina, grandes esforços estão sendo desenvolvidos na formulação de novos fármacos baseados num entendimento molecular do seu mecanismo de ação (12-14). Além da atividade farmacológica contra a malária, esse fármaco também tem sido usado no tratamento de artrite reumatóide (15) e isquemia (16).

A primaquina, uma 8-aminoquinolina, é ativa contra as formas teciduais latentes de *P. vivax* e *P. ovale* (17) e contra os estágios hepáticos do *P. falciparum*. Esse fármaco não exerce atividade contra os estágios eritrocíticos do parasito, mas possui atividade gametocida contra todas as cepas dos plasmódios. Atualmente, é o único fármaco disponível como gametocida contra *P. falciparum*. Apesar de sua importância clínica, a ampla aplicação deste fármaco na terapia profilática é limitada por seus efeitos tóxicos, pois altas doses podem causar anemia hemolítica ou hemólise intravascular aguda em pessoas com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (18, 19). Além disso, como a primaquina pode atravessar a barreira placentária e ser excretada no leite materno (20), esse fármaco não é prescrito durante o período reprodutivo, em razão de sua toxicidade e o não conhecimento total de seu metabolismo (21-23). Apesar de sua toxicidade, a primaquina ainda é um agente profilático importante, pois completa a erradicação dos parasitos, prevenindo, portanto, sua reincidência.

Diante do elevado número de casos graves e óbitos registrados anualmente e em decorrência da crescente resistência que os parasitos vêm adquirindo aos antimaláricos tradicionais, grandes esforços têm sido realizados no desenvolvimento de fármacos alternativos para o tratamento e cura de pacientes portadores de cepas multi-resistentes dos plasmódios e uma busca incessante de mecanismos para evitar o fenômeno da resistência. No desenvolvimento de tal projeto, o conhecimento detalhado dos modos de ação dos fármacos em um nível molecular, pode contribuir de maneira significativa para o desenvolvimento de novas drogas.

Em geral, nos mecanismos de ação de fármacos, muitos eventos distintos, em princípio, podem estar envolvidos. Muitas destas moléculas podem se ligar fortemente a sítios específicos nos tecidos biológicos. Outro evento importante e fundamental na interação de fármacos com tecidos biológicos num nível molecular é a associação deles com membranas. A relevância dos estudos das interações fármaco-membranas fundamenta-se nos possíveis envolvimento de

ligação destes fármacos a proteínas de membranas e/ou indução de modificações na estrutura lipídica, fazendo com que a membrana dispare algum sinal, mediando, portanto, outro evento celular (24-26).

O conhecimento das relações entre a estrutura e a função dos fármacos quando de sua interação com membranas está em constante desenvolvimento, mostrando a importância destas moléculas nos fenômenos fisiológicos que sustentam os processos biológicos. As interações entre fármacos e lipídios podem conduzir a alterações na função de proteínas (27-30), em deslocamentos de proteínas periféricas de membranas por competição com os próprios fármacos (31), podem estar envolvidas em seus próprios mecanismos de ação (29, 32-34), têm importância fundamental no planejamento de lipossomos carreadores de drogas (35), além de a membrana lipídica poder representar o próprio alvo para o fármaco (36-43). Adicionalmente, acredita-se que as interações de anestésicos com membranas sejam importantes em seus mecanismos de ação (44). Percebe-se, portanto, a relevância de estudos das interações fármacos-membranas para um entendimento mais detalhado de seus mecanismos de ação, bem como as modificações induzidas por eles em membranas biológicas.

A compreensão das interações entre fármacos e biomembranas em um nível molecular é, pois, altamente desejável tanto do ponto de vista básico quanto para aplicações em áreas como o desenvolvimento de novos fármacos. Estudar as diferentes formas em que membranas biológicas de diferentes células e organelas podem estar organizadas e, ainda, as suas propriedades físico-químicas e como essas são alteradas por fatores como a composição de lipídios, temperatura, presença de fármacos, peptídeos e proteínas é um tópico que atrai bastante interesse (45-51).

O estudo de membranas biológicas é, no entanto, de difícil execução dada a complexidade de tais estruturas e a sua obtenção não-trivial. Para suplantar este problema faz-se uso das chamadas membranas modelo, cuja composição simples e de fácil controle permite a

investigação de propriedades específicas (por exemplo, composição de lipídios ou associação de fármacos) das membranas biológicas presentes em células vivas. Para perguntas como qual o efeito da presença destas moléculas sobre o comportamento termotrópico ou sobre o polimorfismo da membrana, também se tem procurado respostas pela utilização de metodologias envolvendo uma ou mais técnicas espectroscópicas e modelos de membranas.

Tanto a estrutura dinâmica de membranas lipídicas como as interações fármaco-lipídios em muitos sistemas têm sido estudadas através de diferentes técnicas físicas como calorimetria, fluorescência, espectroscopia de absorção e ressonância magnética nuclear e eletrônica (52-58). Dentre essas técnicas, a calorimetria diferencial de varredura (DSC) tem sido amplamente utilizada nos estudos de transições de fase lipídicas e na variação do comportamento termotrópico dos mesmos na presença de agentes externos, tais como peptídeos, proteínas, fármacos, entre outros. Um perfil termodinâmico completo pode ser gerado através dos experimentos de DSC, com obtenção de parâmetros termodinâmicos relevantes para uma maior compreensão dos mecanismos envolvidos nas interações fármaco-membranas (57, 59), por exemplo. A ressonância paramagnética eletrônica (RPE), por sua vez, tem dado contribuições significativas na identificação e caracterização de fases lipídicas em diferentes sistemas e no estudo de interações fármacos-lipídios, peptídeos-lipídios e proteínas-lipídios (46, 60-66). Esta técnica é de grande utilidade no estudo de tais interações, pois permite monitorar a penetração destas moléculas através da membrana. Para isso, marcadores de spin localizados na cabeça polar e em diferentes posições nas cadeias lipídicas podem fornecer informações sobre a estrutura e dinâmica das mesmas, na presença e na ausência destas moléculas interagentes. Uma análise acurada dos efeitos provocados por estes ligantes na bicamada pode fornecer informações sobre a possível localização destas moléculas.

Infelizmente, os espectros de RPE de muitas biomembranas são complexos e podem ser mal interpretados se apenas uma análise superficial é usada. Uma maneira bastante conveniente de suplantar tal problema é utilizar modelos teóricos para a dinâmica de spins no regime de movimentos lentos em fluidos, tendo muitos desses modelos sido desenvolvidos por Freed e colaboradores (61, 67-69). Assim, espectros de RPE juntamente com simulações espectrais detalhadas baseadas nos modelos de Freed e colaboradores permitem a quantificação de detalhes da estrutura dinâmica da membrana e como esta muda em função de parâmetros como a temperatura e a sua composição, por exemplo (65, 70-72). A identificação e caracterização de fases lipídicas, bem como a determinação de mecanismos moleculares que explicam o comportamento dos lipídios na presença de fármacos são as principais contribuições da metodologia aqui discutida.

Neste trabalho apresentamos o estudo das interações entre os fármacos antimaláricos primaquina e cloroquina com modelos de membranas biológicas. Para isso, foram utilizadas as técnicas de DSC e RPE, no intuito de investigar os efeitos induzidos por ambos os fármacos na estrutura e dinâmica das cadeias lipídicas das membranas, bem como no comportamento termotrópico das bicamadas lipídicas. Para tal, as etapas desenvolvidas são detalhadas e organizadas nesta dissertação como se segue:

➤ **Capítulo 2 – Materiais e Métodos:** apresentação das etapas envolvidas no trabalho experimental, desde a descrição da preparação das amostras de interesse, como a apresentação dos principais fundamentos teóricos concernentes às técnicas físicas utilizadas para os estudos das interações fármacos antimaláricos-membranas, até uma descrição sucinta das metodologias empregadas nas análises dos espectros de RPE;

➤ **Capítulo 3 - Resultados e Discussões:** apresentação pormenorizada dos resultados obtidos com as técnicas de DSC e RPE da interação fármacos-membranas, bem como uma discussão geral dos dados obtidos correlacionando-os com os reportados na literatura;

➤ **Capítulo 4 - Conclusões:** apresentação sucinta das informações obtidas e detalhadas no capítulo 3, discussão comparativa das metodologias empregadas na análise dos espectros de RPE, bem como a indicação de alguns caminhos que podem ser seguidos a partir dos resultados obtidos neste trabalho.

CAPÍTULO 2

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são descritos todos os procedimentos envolvidos na preparação das amostras para as medidas de RPE e DSC, algumas considerações teóricas sobre as técnicas empregadas e as metodologias utilizadas para o tratamento e análise dos dados experimentais obtidos.

2.1 Materiais

O fosfolípido zwitteriônico saturado 1,2-Dimiristoil-sn-Glicero-Fosfocolina (DMPC), assim como os marcadores de spin em diferentes posições da cadeia lipídica 1-Palmitoil-2-Stearoil-(n-DOXIL)-sn-Glicero-3-Fosfocolina (n= 5, 7, 10, 12, 14 e 16-PCSL) foram adquiridos comercialmente da empresa Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL) ou da empresa Sigma Chem. Co. (St. Louis). Os fármacos antimaláricos Difosfato de Primaquina (PQ) e Difosfato de

Cloroquina (CQ) foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Rose Mary Zumstein Georgetto Naal, do Laboratório de Biossensores e Sistemas Microheterogêneos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Todos esses materiais foram utilizados sem outros procedimentos de purificação que não aqueles realizados pelos respectivos fabricantes.

2.2 Preparação de Amostras

O procedimento aqui descrito é geral e vale para todas as amostras a serem usadas nos experimentos de RPE e DSC. Soluções estoque de lipídios e marcadores de spin em clorofórmio são misturadas em tubo de vidro. A massa total de lipídios em cada preparação foi de 0,5 mg para as medidas de RPE e 1 mg para as medidas de DSC. A concentração de marcador de spin é mantida em 0,5 mol% dos lipídios presentes na amostra. Uma vez misturados lipídios e marcadores de spin, a solução final foi evaporada em fluxo de gás nitrogênio, com os lipídios secos formando um filme fino nas paredes do tubo de vidro. A fim de se garantir a completa eliminação de resíduos de clorofórmio das amostras, estas foram submetidas à ultra-centrifugação sob vácuo (Savant Speedvac plus-Thermo Quest) por 2 horas. A seguir, as amostras foram hidratadas em volume adequado de tampão 50 mM Tris/HCl (pH 7,5), na ausência e na presença de 150 mM de NaCl e 5 mM de CaCl₂. Os lipídios foram então raspados das paredes dos tubos, agitados em vórtex e a solução foi sonicada em um sonicador à banho por 15 minutos. Em seguida, foi adicionado às amostras um volume específico dos fármacos em estudo. Soluções de PQ, CQ e DMPC/n-PCSL (n = 5, 7, 10, 12, 14 e 16) foram misturadas em um tubo de vidro com

o tampão acima mencionado. Após agitadas em vórtex por alguns segundos, as amostras foram mantidas no escuro à temperatura ambiente por pelo menos 2 horas para hidratação completa. Em seguida, foram armazenadas em geladeira à temperatura de 10°C por um período de, no mínimo, 5 horas. Para as medidas de RPE com variação de temperatura, as amostras foram transferidas para tubos capilares da marca Satelit (diâmetro de 1,5 mm e volume de 80 µL) e submetidas à centrifugação por 20 minutos. Tal procedimento garantiu a formação de dispersões lipídicas na extremidade dos capilares. Este procedimento foi utilizado com o intuito de aumentar a relação sinal-ruído das amostras nas medidas de RPE. A quantidade de lipídios e fármacos utilizados forneceu uma mistura de fármaco:lipídio na razão molar de 1:5, sendo a concentração final de lipídios de 10 mg/mL para as medidas de RPE e 1mg/mL para as medidas de DSC.

2.3 Medidas de DSC

Os efeitos dos fármacos antimaláricos nas transições de fase das vesículas de DMPC foram observados usando o microcalorímetro VP-DSC da empresa MicroCal (Microcal, Northampton, MA, USA). Todas as amostras foram preparadas conforme procedimento acima descrito. Uma taxa de fornecimento de calor às amostras de 30°C/h em um intervalo de temperatura de 10-40°C foi escolhido. Os termogramas foram registrados apenas durante o aquecimento das amostras. Três preparações independentes de cada amostra sob as mesmas condições foram usadas nas medidas de DSC.

Como o histórico térmico do DSC é um dos parâmetros mais importantes com relação à reprodutibilidade dos termogramas, antes de cada varredura as amostras são mantidas em

equilíbrio térmico à temperatura de 10°C durante 15 minutos. Além disso, para cada preparação independente, um número suficiente de termogramas é registrado até haver a reprodutibilidade entre os mesmos.

A manipulação e análise dos termogramas - como a subtração da resposta calorimétrica do tampão, correção da linha de base e integração dos picos calorimétricos provenientes das transições de fase das vesículas de DMPC - foram realizadas usando-se software fornecido pela Microcal, desenvolvido dentro do pacote Origin 7.0.

2.4 Medidas de RPE

Os espectros de RPE convencional foram registrados em um espectrômetro Varian modelo E-109, operando em banda X (9,4 GHz) e usando uma cavidade retangular Varian E-248. Para as medidas de variação de temperatura das amostras foi utilizado um acessório controlador de temperatura Varian E257-X. A temperatura foi monitorada com um termopar ferro-constantan, conectado a um potenciômetro Fluke (2100A Digital Thermometer). A precisão das medidas foi estimada em $\pm 0,2$ °C. Os parâmetros de operação do equipamento comuns a todas as amostras foram: frequência de modulação, 100 KHz; tempo de varredura, 4 minutos; constante de tempo, 128 ms; varredura do campo magnético, 100 G; potência de microondas, 15 mW e amplitude de modulação do campo, 0,5 G. Utilizamos capilares colocados em tubos de quartzo em banho de óleo mineral comercial posicionados no centro da cavidade de ressonância. O óleo mineral dentro dos tubos de quartzo foi utilizado para garantir a estabilização da temperatura da amostra dentro dos capilares e aumentar a confiabilidade das medidas da mesma. A variação de temperatura

concentrou-se no intervalo de 5-50°C, pois a membrana modelo utilizada (DMPC) possui transição de fase principal em torno de 23°C.

2.5 Métodos - Considerações Teóricas

Nesta seção são apresentadas algumas considerações teóricas sobre as técnicas empregadas no estudo da interação dos fármacos antimaláricos com modelos de membrana para posterior aplicação das metodologias de análise e tratamento dos dados experimentais obtidos.

2.5.1 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A Calorimetria Diferencial de Varredura é uma técnica calorimétrica muito utilizada no estudo da energética conformacional de biopolímeros quando estes são submetidos a uma variação controlada de temperatura. Com isso, é possível se determinar dados termodinâmicos absolutos para transições termicamente induzidas. Esta técnica é frequentemente utilizada no estudo de estabilidade e enovelamento protéicos, caracterização de membranas, lipídios, ácidos nucleicos e sistemas micelares, na avaliação dos efeitos de mudanças estruturais na estabilidade de moléculas, entre outros.

A técnica de DSC também tem sido aplicada em estudos de transições de fase lipídicas tanto em modelos de membranas quanto em membranas biológicas e em suas interações com

pequenas moléculas (hormônios, peptídeos, drogas, fármacos). O conhecimento dos efeitos causados por estas pequenas moléculas quando da sua interação com membranas pode ser de fundamental importância na elucidação dos seus mecanismos de ação. Estas moléculas podem tanto apresentar os próprios lipídios como alvo específico quanto induzir mudanças estruturais e dinâmicas na estrutura da membrana, que pode disparar sinais para mudanças conformacionais em proteínas, possibilitando o acionamento de algum outro mecanismo ou evento biológico importante.

Nos experimentos de DSC, uma amostra e uma referência são aquecidas ou resfriadas a uma taxa constante pré-determinada (dT/dt). Diferenças de temperatura entre as celas de referência e da amostra são medidas e calibradas em unidades de potência (quantidade de calor por unidade de tempo - dQ/dt). Esta potência é, na realidade, uma diferença no fluxo de calor da cela da amostra relativa à cela de referência. Neste caso particular, suspensões lipídicas puras ou com os fármacos antimaláricos foram usadas na cela da amostra e um tampão específico na cela de referência.

Quando a amostra se encontra longe do evento térmico, as temperaturas de ambas as celas mudam linearmente com o tempo à mesma taxa dT/dt , e a diferença de temperatura entre elas permanece zero. Isto se reflete, idealmente, numa linha de base reta e horizontal. Em contrapartida, quando a amostra sofre uma transição de fase termotrópica, há uma diferença detectável de temperatura entre as celas da amostra e de referência e o calorímetro modifica ativamente a entrada de fluxo de calor para a cela da amostra para anular este diferencial de temperatura. Esta diferença de fluxo de calor para ambas as celas se reflete numa deflexão positiva ou negativa da linha de base original, dependendo se o evento é endotérmico ou exotérmico. Concluída a transição de fase, a condição de linha de base original é restabelecida ou uma nova linha de base se estabelece se houver mudança na capacidade térmica da amostra (48).

Esta mudança é mais frequente em estudos de desenovelamento protéico, onde os calores específicos dos estados nativo e desnaturado são diferentes, provavelmente devido a mudanças na hidratação das cadeias laterais que estão “escondidas” no estado nativo, mas tornam-se expostas ao solvente no estado desnaturado.

Como resposta termodinâmica do sistema à taxa de fornecimento de calor, um gráfico da diferença do fluxo de calor (dQ/dt) entre ambas as celas como função da temperatura é gerado na saída do instrumento e a intensidade do sinal é diretamente proporcional à taxa de aquecimento ou resfriamento (dT/dt) da amostra.

Os experimentos de DSC são realizados à pressão constante. É bem conhecido da termodinâmica que, em um processo isobárico, a quantidade de calor fornecida a um sistema é igual à variação de entalpia do mesmo e, usando a própria definição de capacidade calorífica:

$$C_p = \left(\frac{dQ}{dT} \right)_p = \frac{dQ/dt}{dT/dt} = \frac{dH}{dT}$$

A expressão acima mostra que o termograma gerado pelo calorímetro fornece a dependência com a temperatura da capacidade calorífica isobárica da amostra.

Em um experimento de transição de fase em um biopolímero simples (hipotético termograma apresentado na Figura 2), o DSC pode diretamente medir ou permitir o cálculo de alguns parâmetros termodinâmicos importantes que caracterizam uma molécula biológica. Por exemplo, a entalpia calorimétrica total de algum evento termicamente induzido na amostra pode ser determinada através da área sob a curva obtida:

$$\Delta H_{cal} = \int C_p(T) dT$$

Figura 2. Endoterma caracterizando um evento térmico em um biopolímero hipotético. A entalpia calorimétrica é a área sob a curva que mostra a dependência com a temperatura da capacidade calorífica da amostra à pressão constante. O ΔC_p do processo é definido na temperatura de *melting* (T_M) ou temperatura de transição de fase, onde a capacidade calorífica apresenta um máximo.

A temperatura de transição de fase, usualmente denotada por T_M , é aquela na qual a capacidade calorífica atinge um máximo e, em casos como o desenovelamento protéico, é um indicativo da estabilidade do sistema. Em transições de fase de primeira ordem, tal como a transição da fase gel para a líquido-cristalina em fosfatidilcolinas (73), a variação da energia livre de Gibbs (ΔG) na temperatura de transição é nula, portanto a mudança na entropia associada com a transição pode ser calculada diretamente da equação:

$$\Delta S = \frac{\Delta H_{cal}}{T_M}$$

A mudança na capacidade calorífica à pressão constante (ΔC_p na Figura 2) do evento termotrópico também pode ser diretamente medida nos termogramas. Outro parâmetro

importante está relacionado com o grau de cooperatividade do processo experimentado pelas moléculas na amostra. Quanto menor a largura em temperatura à meia altura na curva de transição, $\Delta T_{1/2}$, maior será a cooperatividade naquele processo termotrópico. Os valores de $\Delta T_{1/2}$ podem variar desde cerca de 0,1°C, para fosfolipídios sintéticos muito puros, até 10 a 15°C para membranas biológicas. Dos valores de T_M e $\Delta T_{1/2}$ determinados para uma transição de fase em um fosfolipídio, a entalpia de van't Hoff, ΔH_{VH} , pode ser aproximadamente determinada através da relação

$$\Delta H_{VH} \cong 6.9 \frac{T_M^2}{\Delta T_{1/2}}$$

A razão entre as entalpias calorimétrica e de van't Hoff fornece o valor da unidade cooperativa, **n**:

$$n = \frac{\Delta H_{VH}}{\Delta H_{cal}} \alpha \frac{1}{\Delta T_{1/2}}$$

Este parâmetro é uma medida indireta do grau de cooperação intermolecular entre os fosfolipídios em uma vesícula, por exemplo. É bem sabido que, em uma transição de fase lipídica, os fosfolipídios não transicionam independentemente uns dos outros, e sim, em forma de aglomerados lipídicos (74-76). O valor de **n** representa, por conseguinte, o número médio de moléculas de lipídios nestes aglomerados que participam da transição de fase como uma unidade cooperativa. Em um processo de primeira ordem completamente cooperativo de uma substância pura, **n** deve tender ao infinito e para um processo completamente não-cooperativo, este parâmetro deve tender à unidade. Note que **n** é inversamente proporcional a $\Delta T_{1/2}$. Isto reforça o fato de que quanto mais isotérmica é uma transição, mais cooperativo é o sistema.

Resumindo, a técnica de DSC é uma ferramenta analítica de fácil manuseio, comparativamente mais simples e muito útil no estudo termodinâmico de transições de fase de lipídios, permitindo o entendimento de mudanças entálpica e entrópica que ocorrem quando um biopolímero passa por um evento termicamente induzido e os efeitos causados por agentes externos quando interagem com ele.

2.5.2 Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) e o Radical Nitróxido

A espectroscopia de RPE como todas as outras formas de espectroscopia monitora a absorção de energia de um campo de radiação quando moléculas mudam seus estados de energia. Se a molécula possuir um momento magnético não-nulo, este dipolo interage com a componente magnética do campo de radiação. Porém, os níveis de energia devidos à presença de dipolos magnéticos coincidem (são degenerados) e nenhuma transição ocorre, a menos que seja aplicado um campo magnético estático externo separando-os, possibilitando desta maneira, a observação de transições entre os estados de energia. Esta é a base da espectroscopia de RPE. Portanto, para realizar medidas de RPE, é de fundamental importância que as moléculas possuam elétrons desemparelhados.

A grande maioria dos sistemas biológicos, no entanto, é diamagnética, ou seja, não possui momento de dipolo magnético total não-nulo e assim não produzem sinais de RPE. Um recurso muito utilizado atualmente para se estudar tais sistemas através desta técnica envolve a utilização do método de marcadores ou sondas de spin. O marcador de spin é uma molécula orgânica

portadora de um radical livre paramagnético. Em princípio, é importante que o radical seja estável nas condições de pH, temperatura e concentração salina normalmente encontradas nos sistemas biológicos. Neste trabalho, o marcador consiste de um fosfolipídio contendo um grupamento paramagnético, o radical nitróxido (N-O), ligado covalentemente à molécula repórter outra designação para estas sondas de spin. Esta designação é fundamentada no fato que, uma vez introduzidos nos sistemas biológicos, estas moléculas dão informações sobre o meio em que se encontram, ou seja, reporta-os. O sinal de RPE destes radicais é sensível à polaridade, viscosidade, acidez, estrutura e ordem do meio, além de depender de possíveis restrições de seu movimento.

A estrutura química do radical nitróxido é dada pela fórmula química geral apresentada na Figura 3.

Figura 3. Estrutura química do radical nitróxido.

O sinal de RPE é produzido pelo elétron desemparelhado localizado na ligação N-O e o radical pode ser ligado covalentemente a uma molécula maior através da reação dos grupos R₁ e R₂.

Uma das principais características destes radicais é a estabilidade devida parcialmente à proteção estérica da ligação N-O pelos quatro grupos metil adjacentes (77,78). Devido a esta

proteção estérica, as outras partes da mesma molécula (isto é, os substituintes R_1 e R_2) podem ser facilmente modificadas sem o envolvimento do elétron desemparelhado do grupo NO, formando assim os diversos marcadores de spin de radicais nitróxidos.

Como estamos interessados no estudo de interações de pequenas moléculas com modelos de membranas, é comum se utilizar o grupo N-O ligado a fosfolipídios, ácidos graxos ou seus derivados (Figura 4A), com o objetivo de monitorar a estrutura e a dinâmica do ambiente lipídico em torno do marcador. Para isso, os marcadores são intercalados fisicamente em bicamadas lipídicas (Figura 4B). As informações estruturais obtidas são refletidas sobre o ordenamento do marcador e as informações sobre a dinâmica lipídica, em sua mobilidade, ou seja, na fluidez do ambiente no qual o marcador se encontra. A fluidez é essencial para o funcionamento das membranas e depende das moléculas que a compõem como, por exemplo, o colesterol.

Nos experimentos de RPE, o momento magnético dos elétrons desemparelhados interage com todo e qualquer campo magnético que perturba a região na qual tais elétrons se encontram. A forma destas interações é sempre a mesma: $-\vec{\mu} \cdot \vec{H}$, onde $\vec{\mu}$ é o momento magnético associado ao elétron desemparelhado e $\vec{H}$ é o campo magnético experimentado por $\vec{\mu}$. No entanto, para efeito de análise e quantificação da magnitude de tais interações para posterior interpretação dos espectros de RPE, o campo magnético total “sentido” pelos elétrons desemparelhados é dividido em vários termos. O primeiro termo é o campo magnético estático externo $\vec{H}_0$ aplicado pelo eletroímã sobre a amostra. Este promove o levantamento da degenerescência de spin e é chamado de interação Zeeman eletrônica. O próprio elétron desemparelhado produz um campo magnético que interage com dipolos de outras moléculas e vice-versa. Esta interação é chamada de dipolar magnética. Outra possível interação elétron-elétron ocorre quando as funções de onda eletrônicas se misturam. O princípio de Pauli aplicado a esta sobreposição de funções de onda e a natureza

coulombiana da repulsão eletrônica dão origem à interação de troca. Os efeitos destes termos são importantes para birradicais (79). Caso haja uma baixa concentração de marcadores de spin na amostra, esta última interação é praticamente desprezível.

Figura 4. (A) Estrutura do marcador de spin 5-PCSL. O grupamento nitróxido está localizado no carbono 5 da cadeia lipídica, monitorando a região próxima à cabeça polar. (B) Esquema ilustrativo dos marcadores de spin 5-PCSL intercalados com fosfolípidios em bicamadas. A linha tracejada refere-se à região mais fortemente monitorada pela sonda de spin. Figura adaptada de (80).

Quando um átomo possui núcleo com spin não-nulo, o campo magnético produzido pelo dipolo nuclear interage com o dipolo do elétron desemparelhado, dando origem à interação hiperfina quando este elétron interage com o núcleo do próprio átomo, e superhiperfina, quando interage com núcleos de átomos vizinhos. Esta segunda interação normalmente possui magnitude menor comparada a primeira e pode ser, em princípio, desprezada. A interação hiperfina é de fundamental importância para investigação dos espectros de RPE, pois é ela que dá surgimento à

estrutura de multipletos. Além disso, o dipolo magnético nuclear também interage com o campo magnético externo, dando origem à interação Zeeman nuclear, de magnitude mil vezes menor que a Zeeman eletrônico, devido à razão das massas de elétron e próton ser dessa ordem de grandeza.

Adicionalmente às interações magnéticas entre os dipolos na amostra, há também interações destes com campos magnéticos produzidos pelo espectrômetro. Em experimentos de RPE, a dificuldade na construção de geradores de microondas com grande estabilidade na varredura da frequência de ressonância levou à realização do monitoramento da absorção de radiação pela amostra com relação à varredura de campo magnético, e não com relação à frequência de ressonância. Este incremento instrumental de varredura de campo, $\Delta \vec{H}_z$ também interage com os dipolos magnéticos. Além disso, na grande maioria das situações práticas, o sinal detectado é extremamente débil e, portanto, difícil de ser separado do ruído intrínseco do equipamento. Uma das técnicas utilizadas para aumentar a sensibilidade (ou relação sinal-ruído) é a de transformar o sinal DC correspondente à absorção em um sinal AC, de amplitude proporcional ao sinal original DC, através da modulação do campo magnético por meio de bobinas. A amplitude do campo de modulação AC está normalmente na faixa de alguns mG até dezenas de G, dependendo da largura de linha do sinal observado. Como a maior parte do ruído neste equipamento é do tipo $1/f$, a frequência da modulação é escolhida a mais alta possível, geralmente padronizada em 100 KHz.

Por fim, o campo responsável pelas transições entre os níveis é o campo magnético da radiação eletromagnética. Este oscila ao longo do que se convencionou chamar eixo x perpendicular à direção do campo estático, usualmente aplicado ao longo do eixo z.

Para um radical livre no qual o spin eletrônico interage através do acoplamento hiperfino com um núcleo de spin I, o hamiltoniano total é dado por (81):

$$\mathcal{H} = \beta \vec{H}_0 \cdot \vec{g} \cdot \vec{S} + \vec{S} \cdot \vec{A} \cdot \vec{I} + \mathcal{H}_l + 2\vec{H}_1 \cos(\omega t)$$

onde o primeiro termo corresponde a interação Zeeman eletrônica, o segundo, a interação hiperfina, $\mathcal{H}_l$ representa a interação do dipolo eletrônico com o campo local devido aos momentos magnéticos vizinhos e o último termo, a interação com o campo de radiação. Os tensores de segunda ordem $\vec{g}$ e $\vec{A}$ são chamados de tensores giromagnético e hiperfino, respectivamente. A quantidade β é chamada de magnéton de Bohr eletrônico.

O hamiltoniano hiperfino possui duas contribuições:

$$\mathcal{H}_{hf} = \vec{S} \cdot \vec{A} \cdot \vec{I} = \vec{S} \cdot (\vec{A}' + a) \cdot \vec{I} = -g_e \beta g_N \beta_N \left\{ \frac{(\vec{S} \cdot \vec{I}) r^2 - 3(\vec{S} \cdot \vec{r})(\vec{I} \cdot \vec{r})}{r^5} - \frac{8\pi}{3} (\vec{I} \cdot \vec{S}) \delta(\vec{r}) \right\}$$

onde g_e é o fator-g do elétron livre, g_N o fator-g do núcleo, β_N o magnéton de Bohr nuclear, $\mathbf{r}$ é a distância elétron-núcleo e $\delta(\vec{r})$, a função delta de Dirac.

O primeiro termo descreve a interação dipolar elétron-núcleo e depende da orientação relativa dos dipolos no espaço. Os elementos de $\vec{A}'$ são dados por:

$$A'_{ij} = -g_e \beta g_N \beta_N \left\langle \frac{r^2 \delta_{ij} - 3x_i x_j}{r^5} \right\rangle$$

onde o símbolo $\langle \rangle$ denota integração sobre a distribuição eletrônica. Este termo é simétrico e tem traço nulo.

O segundo termo descreve a interação de contato de Fermi que surge da probabilidade finita de se encontrar o elétron na posição do núcleo. Esta interação é isotrópica, ou seja, não depende da orientação da molécula com relação ao campo magnético e é representada por:

$$\mathcal{H}_{CF} = a \vec{S} \cdot \vec{I}$$

onde a constante de acoplamento isotrópico “a” é dada por:

$$a = \frac{8\pi}{3} g_e \beta g_N \beta_N |\Psi(0)|^2$$

com $\Psi(0)$ representando a função de onda do elétron desemparelhado na posição do núcleo.

Com isso, $|\Psi(0)|^2$ representa a probabilidade de encontrá-lo nesta posição.

Se a distribuição eletrônica tem simetria esférica, ou seja, é representada por um estado s (orbital s), então a integração do operador dipolar em relação às coordenadas eletrônicas é nula. Portanto, somente se o elétron desemparelhado estiver num estado p, d, f, ..., a interação dipolar estará presente, que é o caso dos radicais nitróxidos (orbital p). O termo isotrópico de contato requer densidade eletrônica finita na posição do núcleo, o que só pode ser oferecido pela função de onda do tipo s.

Se as espécies paramagnéticas são diluídas em solventes de baixa viscosidade, então as reorientações moleculares rápidas devido ao movimento térmico fazem uma média nos termos anisotrópicos do hamiltoniano de spin. A posição do espectro no campo e a grandeza dos desdobramentos hiperfinos são então determinadas por valores médios dos elementos diagonais dos tensores $\vec{g}$ e $\vec{A}$. Neste caso, para um campo magnético externo $\vec{H}_0$ aplicado na direção z, o hamiltoniano magnético do sistema se reduz a:

$$\mathcal{H}_{mag} = g_0 \beta H_0 S_z + A_0 \vec{S} \cdot \vec{I} = g_0 \beta H_0 S_z + A_0 S_z I_z + A_0 (S_+ I_- + S_- I_+)$$

onde $g_0 = \frac{g_{xx} + g_{yy} + g_{zz}}{3}$ e $A_0 = \frac{A_{xx} + A_{yy} + A_{zz}}{3}$ são os valores médios dos tensores

giromagnético e hiperfino. Os operadores $T_{\pm} = T_x \pm iT_y$, válidos para $\vec{S}$ e $\vec{I}$, são chamados de operadores levantamento (T_+) e abaixamento (T_-) de spin. Estes são responsáveis por uma mistura de estados quando utilizamos teoria de perturbação independente do tempo em segunda ordem. Fixando nosso tratamento até primeira ordem em teoria de perturbação, os níveis de energia do hamiltoniano acima sem o último termo são:

$$E(M_S, M_I) = g_0 \beta H_0 M_S + A_0 M_S M_I$$

com $M_S = \pm 1/2$ e $M_I = -I, -I+1, \dots, I-1, I$. O diagrama de níveis está apresentado na Figura 5.

Considerando agora o acoplamento radiação-matéria

$$\mathcal{H}_{rm} = g_0 \beta H_1 S_x \cos(\omega t)$$

onde o campo $\vec{H}_1$ é, em geral, muito menor que o campo estático $\vec{H}_0$, portanto $\mathcal{H}_{rm}$ pode ser tratado como perturbação dependente do tempo atuando sobre os autoestados de $\mathcal{H}_{mag}$. Podemos verificar então que o efeito de $\mathcal{H}_{rm}$ é o de induzir transições entre os autoestados α e α' de $\mathcal{H}_{mag}$ (com autovalores E_α e $E_{\alpha'}$). A probabilidade de transição $W_{\alpha\alpha'}$, dada pelo número de transições

por segundo, do estado α para o estado α' , é obtida pela regra de ouro de Fermi da teoria de perturbação dependente do tempo:

$$W_{\alpha\alpha'} = \frac{2\pi}{\hbar} g_0^2 \beta^2 H_1^2 \left| \langle \alpha | S_x | \alpha' \rangle \right|^2 \delta(E_\alpha - E_{\alpha'} - \hbar\omega)$$

onde δ é a função delta de Dirac que impõe a condição de que $W_{\alpha\alpha'}$ é nulo a menos que o *quantum* de energia $\hbar\omega$ seja exatamente igual à diferença de energia $E_\alpha - E_{\alpha'}$ entre os estados α e α' . A condição para que $\langle \alpha | S_x | \alpha' \rangle$ não seja nulo pode ser obtida se usarmos os operadores $S_\pm = S_x \pm iS_y$. Desta análise resulta que as transições devem obedecer à regra de seleção $\Delta M_s = \pm 1$ e $\Delta M_I = 0$.

No caso de um radical nitróxido, o spin nuclear $I = 1$, portanto os autovalores do operador I_z são dados em termos de $M_I = -1, 0$ e $+1$. A condição de ressonância para o hamiltoniano $\mathcal{H}_{mag}$ é então, dada por:

$$h\nu = g_0 \beta H_0 + A_0 M_I$$

Desta expressão, fica claro que para uma mesma frequência de ressonância ν , a linha de campo baixo é representada por $M_I = +1$ e a de campo alto por $M_I = -1$ (Figura 5).

Figura 5. (A) Diagrama de níveis representando o desdobramento Zeeman eletrônico e interação hiperfina em primeira ordem em teoria de perturbação. O spin nuclear do ^{14}N do radical nitróxido vale $I=1$. São indicadas as transições eletrônicas para um único elétron de spin $S=1/2$. (B) Primeira derivada da curva de absorção de um radical nitróxido num meio isotrópico de baixa viscosidade. Adaptada de (81).

Anisotropia Espectral

Uma propriedade importante dos radicais nitróxidos é a anisotropia do fator- g e do desdobramento hiperfino em relação à orientação do campo magnético aplicado. Estas anisotropias são representadas pelos tensores de segunda ordem $\vec{g}$ e $\vec{A}$ cujos eixos principais estão orientados na molécula da seguinte forma (Figura 6): o eixo x normalmente coincide com a ligação N-O, o eixo z está direcionado ao longo do orbital $2p\pi$ e o eixo y perpendicular a ambos.

Os eixos principais de ambos os tensores normalmente coincidem, porém, esta coincidência não é obrigatória.

Figura 6. Representação do sistema de coordenadas do radical nitróxido.

Independentemente do fato da molécula encontrar-se num meio cristalino ou amorfo, esta se apresenta na maioria dos casos com uma simetria local que geralmente lhe confere um caráter anisotrópico. Quando aplicamos um campo magnético externo nas direções moleculares do radical nitróxido, observamos comportamentos espectrais distintos. Estas mudanças estão associadas à perda de simetria do orbital atômico do átomo de nitrogênio do radical, produzindo interações distintas ao longo destas direções particulares. Os efeitos do desdobramento anisotrópico e os valores de g são mais facilmente entendidos considerando o espectro de um radical nitróxido introduzido num monocristal. Caso o campo magnético externo seja aplicado ao longo do eixo z desta molécula, onde está localizado cerca de 80% da densidade eletrônica, temos um maior desdobramento da constante de acoplamento hiperfino isotrópico (Figura 7). Por outro lado, a constante hiperfina é menor quando o campo é aplicado ao longo das direções x e y . O fator- g também se modifica com a direção de aplicação do campo magnético. A componente g_{zz} geralmente possui o menor valor porque é a que mais se aproxima do elétron livre, ao passo que g_{xx} é a componente que possui a maior diferença em relação ao fator- g do elétron livre. A Figura

7 mostra claramente a dependência do fator-g e do desdobramento hiperfino com relação à direção do campo magnético aplicado.

Figura 7. Anisotropia espectral de um radical nitróxido como impureza em um cristal diamagnético. Os valores principais dos elementos diagonais dos tensores são: $g_{xx} = 2,0088$, $g_{yy} = 2,0058$ e $g_{zz} = 2,0021$; $A_{xx} = 5,9$ G, $A_{yy} = 5,4$ G e $A_{zz} = 32,9$ G (82). Campo magnético externo aplicado na direção (A) x, (B) y e (C) z. Figura adaptada das referências (80 e 82).

Agora, no caso do radical nitróxido estar girando em solução, a forma do espectro se modifica de acordo com os diferentes regimes de movimento. Se assumirmos que as cadeias podem rodar rapidamente somente em torno do eixo do lipídio (normal $\hat{n}$) conforme Figura 8, ou seja, com movimento restrito ao eixo z do marcador alinhado com a normal da bicamada, então os valores de A_{xx} e A_{yy} são promediados e A_{zz} tem o maior valor. Os valores de A_{xx} e A_{yy} são praticamente iguais devido à simetria axial, então este movimento tem um efeito pequeno sobre o espectro, este tomando a forma de um espectro rígido (Figura 9A). Se as cadeias acila podem agora se inclinar e oscilar com um ângulo não nulo em torno da normal à membrana, a amplitude

do movimento é aumentada, pois há movimento adicional nos outros planos e A_{zz} se mistura com A_{xx} e A_{yy} . Isto reduz o valor de A_{zz} , mas aumenta o de A_{xx} , então um pequeno desdobramento pode ser resolvido no espectro (Figura 9B). O valor medido de A refletindo uma promediação do movimento rápido de A_{zz} é o $A_{//}$. Similarmente, $A_{\perp}$ reflete a promediação do movimento rápido de A_{xx} e A_{yy} . As larguras de linha estreitas são também indicativas de movimento rápido (Figura 9C). No limite de movimento isotrópico, $A_{//} = A_{\perp}$ (80).

Figura 8. Definição das direções das componentes do tensor hiperfino. A forma do espectro se modifica de acordo com o ângulo θ da cadeia do marcador com a direção normal da bicamada (80).

Se os movimentos são significativamente anisotrópicos, é possível medir-se $A_{//}$ e $A_{\perp}$ com precisão. Por outro lado, para espectros que representam marcadores com pouca mobilidade, o valor de A_0 só pode ser obtido por meio de simulações espectrais.

Figura 9. Anisotropia do espectro de RPE do marcador de spin sob várias condições: (A) limite rígido – rotação em torno do eixo z somente, (B) aumento na amplitude de movimento devido a inclinação e oscilação das cadeias lipídicas na bicamada, e (C) movimento isotrópico rápido (83).

2.6 Análise dos Espectros de RPE

Uma vez de posse dos espectros de RPE, duas metodologias são freqüentemente utilizadas para o tratamento e análise dos dados experimentais obtidos: a análise convencional, baseada na definição de alguns parâmetros empíricos sobre o próprio espectro de RPE e a utilização de simulações espectrais. Ambas as metodologias apresentam vantagens e desvantagens em sua utilização e conduzem a informações valiosas sobre a estrutura e dinâmica de lipídios em

modelos de membrana biológicas e na detecção de efeitos locais nos mesmos causados por agentes externos. Nesta seção são descritas sucintamente ambas as metodologias empregadas.

2.6.1 Análise Convencional: Parâmetros Empíricos

A aplicação da técnica de marcadores de spin no estudo de sistemas biológicos em solução permite, geralmente, obter informações sobre o movimento do marcador no sistema. A partir destas informações é possível estudar a dinâmica, a estrutura e a ordem dos mesmos. Contudo, devido à grande sensibilidade destes à polaridade, viscosidade, acidez, estrutura e ordem do meio, entre outros parâmetros, seus espectros são de difícil análise. Muitas vezes é necessário fazer simulações espectrais para se obter informações mais detalhadas. Entretanto, tais simulações envolvem cálculos bastante extensos e considerações teóricas complexas no sentido de reproduzir os resultados e muitas vezes a caracterização pretendida é alcançada por meio de uma análise baseada em parâmetros empíricos aqui apresentados.

Nas aplicações do método do marcador de spin em solução, um dos parâmetros mais importantes na análise dos resultados é o tempo de correlação rotacional, que reflete a dinâmica molecular do meio. O cálculo do tempo de correlação a partir de parâmetros definidos no espectro é possível graças à existência das anisotropias do fator-g e do desdobramento hiperfino.

Existem várias teorias envolvendo a definição de parâmetros nos espectros que conduzem a fórmulas práticas para efetuar a avaliação do tempo de correlação do radical no sistema estudado. Geralmente são distinguidos três intervalos relativos ao grau de movimento do radical.

Na região de movimento rápido onde o tempo de correlação, τ_C , é menor de 10^{-9} s, a sensibilidade dos espectros às mudanças de τ_C é muito boa e a maneira prática de avaliá-lo é a mais simples de todas. No regime de movimento lento, onde 10^{-9} s $< \tau_C < 10^{-7}$ s, o método ainda apresenta boa sensibilidade, no entanto, para obter avaliações melhores tem sido usada a técnica de simulação dos espectros. O método de simulação espectral utilizado neste trabalho está apresentado na próxima seção. A região de movimento “rígido” ($\tau_C > 10^{-7}$ s) é aquela em que os espectros apresentam menos sensibilidade.

É bem conhecido que alguns parâmetros empíricos definidos sobre o espectro de RPE podem nos fornecer informações valiosas a respeito da dinâmica e da estrutura dos marcadores de spin em membranas. Contudo, a escolha destes parâmetros depende do marcador de spin utilizado e de sua sensibilidade à temperatura, bem como da precisão das medidas no espectro. Esta é uma das grandes desvantagens em se utilizar tal metodologia para investigar marcadores de spin em membranas. Simulações espectrais, em princípio, valem para todo e qualquer tipo de marcador.

Na seção 2.5.2 (Figura 9C) foi apresentado um espectro de radical nitróxido em um ambiente isotrópico apresentando três linhas estreitas de igual altura. Se representarmos as amplitudes de cada linha por h_{+1} , h_0 e h_{-1} , correspondendo respectivamente, aos números quânticos do nitrogênio $M_I = +1$, $M_I = 0$ e $M_I = -1$, conforme Figura 10, as razões das amplitudes h_{+1}/h_0 e h_{-1}/h_0 são os melhores parâmetros a serem usados para os marcadores de spin que possuem grande mobilidade. É interessante mencionar que a temperatura de transição principal do lipídio é mais abrupta quando monitorada por marcadores de spin próximos ao centro da bicamada, que por marcadores próximos à superfície (84). Isto porque a região dos marcadores próximos à superfície é menos sensível a variação de fluidez da membrana na temperatura de

transição. Além disso, para avaliar a anisotropia do espectro, o parâmetro h_{-1}/h_0 é mais sensível que o parâmetro h_{+1}/h_0 para temperaturas acima da transição de fase lipídica, pois a amplitude de campo alto se estreita mais com o aumento da temperatura que a amplitude de campo baixo. Se ambas as razões se aproximam da unidade, mais isotrópico estará o espectro, refletindo, portanto, uma maior fluidez e menor empacotamento da membrana. Ambos os parâmetros são frequentemente usados com o marcador de spin 16-PCSL, pois este é o que apresenta maior mobilidade dos marcadores da cadeia acila de lipídios.

Figura 10. Espectros de RPE de um radical nitróxido em um ambiente levemente anisotrópico apresentando as definições dos parâmetros empíricos utilizados para a análise convencional dos mesmos em dois regimes de movimento: (A) regime de movimento rápido e (B) regime de movimento lento. Estes parâmetros espectrais são utilizados na investigação da dinâmica e ordem do radical em membranas.

Outro parâmetro medido diretamente do espectro de RPE que também é utilizado na análise do sistema em estudo é o desdobramento hiperfino máximo (A_{MAX}). Este pode ser usado como parâmetro que aumenta com a viscosidade ou empacotamento do micro-ambiente sentido pelo marcador (82). À medida que energia térmica é fornecida à bicamada lipídica, o valor de A_{MAX} diminui gradualmente até que na temperatura de transição de fase do lipídio ocorre uma queda abrupta desse valor, indicando uma mudança da fase gel para a fase fluida da cadeia

hidrocarbônica da bicamada e, conseqüentemente, uma redução de seu empacotamento. Esta análise, entretanto é frequentemente aplicada apenas para marcadores de spin que possuem maiores restrições em seu movimento. Ainda para estes espectros altamente anisotrópicos, as mudanças no empacotamento das cadeias acila e na polaridade da região monitorada por estes marcadores podem ser quantificadas através da determinação do parâmetro de ordem efetivo (S_{EFF}) e do desdobramento hiperfino isotrópico (a_0) através da expressão (85, 86)

$$S_{EFF} = \frac{A_{//} - A_{\perp}}{A_{zz} - (1/2)(A_{xx} + A_{yy})} \frac{a'_0}{a_0}$$

onde $a_0 = \frac{A_{//} + 2A_{\perp}}{3}$ é o fator de correção da polaridade do solvente, $a'_0 = \frac{A_{xx} + A_{yy} + A_{zz}}{3}$ é a constante hiperfina isotrópica num sistema molecular rígido, $A_{//} \approx A_{MAX}$ é o desdobramento hiperfino máximo diretamente medido no espectro (Figura 10B) e

$$A_{\perp} = A_{min} + 1.4 \left[1 - \frac{A_{//} - A_{min}}{A_{zz} - (1/2)(A_{xx} + A_{yy})} \right]$$

onde $2A_{min}$ é a medida do desdobramento hiperfino mínimo (Figura 10B). Os valores principais do tensor hiperfino para o doxilpropano usado foram $A_{xx} = 5.9$ G , $A_{yy} = 5.4$ G e $A_{zz} = 32.9$ G (60).

2.6.2 Simulações espectrais

Outro método de análise dos espectros de RPE e quantificação dos parâmetros que caracterizam a dinâmica e ordenamento dos marcadores de spin inseridos em bicamadas lipídicas é o método de simulação computacional. Um método de análise muito usado atualmente é baseado na equação estocástica de Liouville (67, 87), o qual mostra que as grandes mudanças no espectro são particularmente sensíveis aos detalhes microscópicos da dinâmica do sistema. O programa NLSL utilizado para as simulações espectrais deste trabalho usa este método de análise e foi desenvolvido por Freed e colaboradores (69).

Esses métodos de análise permitem um estudo quantitativo dos espectros de RPE em termos de taxas de movimento do radical nitróxido e das restrições ao movimento impostas pela estrutura em torno do mesmo. Estas taxas de movimento e restrições levam a um tensor de difusão rotacional (onde se calcula o tempo de correlação rotacional) e a um parâmetro de ordem, respectivamente.

É bem conhecido da teoria quântica que toda a informação para o cálculo de quantidades observáveis de um sistema quântico está contida na matriz densidade ρ . Assumindo uma dependência temporal $H(t)$ no Hamiltoniano de spin do radical nitróxido originada de suas interações com a vizinhança, a matriz densidade é determinada através da equação quântica de movimento de Liouville

$$\frac{\partial}{\partial t} \rho = -i[H(t), \rho]$$

Entretanto, para o cálculo dos espectros de RPE no regime de movimento lento, as flutuações na orientação de uma molécula podem ser descritas classicamente usando-se um operador markofiano de evolução Γ_{Ω} , onde a coordenada ou estado Ω representa os ângulos de Euler do radical. Neste regime, os tempos de correlação do radical nitróxido são da ordem de 10^{-7} até 10^{-9} s (67) e a teoria de perturbação de Redfield para a determinação da forma da linha espectral não pode ser mais aplicada. Assumindo que a dependência temporal de Ω é descrita por um processo markofiano estacionário, a probabilidade $P(\Omega, t)$ de se achar o radical na orientação Ω em um tempo t é:

$$\frac{dP(\Omega, t)}{dt} = -\Gamma_{\Omega} P(\Omega, t)$$

Kubo (88) e Freed (89-91) mostraram que, utilizando esta hipótese, a equação de movimento do operador matriz densidade $\rho(\Omega, t)$ conduz à equação estocástica de movimento de Liouville:

$$\begin{aligned} \frac{\partial}{\partial t} \rho(\Omega, t) &= -i[H(\Omega), \rho(\Omega, t)] - \Gamma_{\Omega} \rho(\Omega, t) \\ &= -L\rho(\Omega, t) \end{aligned}$$

onde a dependência temporal explícita do Hamiltoniano de spin desaparece e passa a ser modulada, devido a movimentos rotacionais, pela dependência temporal de Ω . O operador markofiano de evolução Γ_{Ω} é chamado de operador relaxação do radical e representa a difusão rotacional molecular do mesmo e $\mathbf{L}$ é o superoperador de Liouville que governa a evolução quântica dos spins eletrônico e nuclear. A partir da solução numérica da equação acima e de

valores de entrada de alguns parâmetros definidos pelo usuário, os espectros teóricos de RPE são gerados através da equação matricial:

$$I(\Delta\omega) = \left\langle \nu \left| \left[\tilde{\Gamma}(-iL) + iI\Delta\omega \right]^{-1} \right| \nu \right\rangle$$

onde $\tilde{\Gamma}$ é o operador de difusão “simetrizado”, $\mathbf{1}$ é a matriz unitária e $|\nu\rangle$ é um vetor representando a magnetização observável, incluindo o operador de spin S_z e a distribuição de equilíbrio de orientações do marcador de spin. Mais detalhes sobre a teoria desenvolvida para o cálculo dos espectros de RPE no regime de movimento lento podem ser encontradas nas referências supracitadas.

Sistemas de Coordenadas

O programa de simulação faz uso dos seguintes sistemas de coordenadas para estudar a dinâmica rotacional e ordenamento orientacional do marcador de spin: o sistema de coordenadas magnético ($\mathbf{x}_m, \mathbf{y}_m, \mathbf{z}_m$), o sistema diretor local ($\mathbf{x}_d, \mathbf{y}_d, \mathbf{z}_d$), o sistema de difusão rotacional molecular ($\mathbf{x}_R, \mathbf{y}_R, \mathbf{z}_R$) e o sistema do laboratório ($\mathbf{x}_L, \mathbf{y}_L, \mathbf{z}_L$) no qual o campo magnético estático externo é definido usualmente na direção $\mathbf{z}_L$.

O sistema de coordenadas magnético foi definido na seção 2.5.2 e pode ser visualizado na Figura 6. É em relação a este sistema que são definidos os tensores $\mathbf{g}$ e $\mathbf{A}$. O terceiro sistema de coordenadas é o sistema do potencial de orientação da bicamada, também chamado de sistema diretor local, no qual o eixo $\mathbf{z}_d$ é definido como paralelo à normal à superfície da bicamada em cada ponto da mesma. O eixo $\mathbf{z}_d$ é chamado de eixo de ordenamento local ou diretor local e é

usado para definir os ângulos Ψ referentes ao efeito de ordenamento microscópico e desordenamento macroscópico (MOMD) descrito abaixo.

A difusão rotacional molecular dos marcadores de spin inseridos em membranas lipídicas é normalmente descrita em termos de um tensor de difusão rotacional $\mathbf{R}$ (especificado pelo operador de relaxação Γ_{Ω}) com simetria axial, ou seja, a mobilidade rotacional dos mesmos é caracterizada pelas componentes principais, $R_{//}$ e $R_{\perp}$, deste tensor. O sistema de difusão molecular é, então, definido em termos destas duas taxas de difusão rotacional. Neste sistema de coordenadas, o eixo $\mathbf{z}_R$ é definido paralelamente ao eixo de simetria do segmento da molécula onde o radical nitróxido encontra-se ligado. Por exemplo, em marcadores do tipo n-PCSL (n especifica a posição do radical nitróxido ao longo da cadeia lipídica) usados neste trabalho, o eixo $\mathbf{z}_R$ é paralelo ao diretor local, ou seja, à própria cadeia lipídica (Figura 11). Por conseguinte, $R_{//}$ representa a taxa de difusão rotacional em torno do eixo $\mathbf{z}_R$ e $R_{\perp}$, a taxa em torno de um eixo perpendicular a ele, ou seja, o movimento oscilatório da respectiva porção da cadeia lipídica (Figura 11).

Potencial de Orientação e Parâmetros de Ordem

Os lipídios e os marcadores de spin inseridos em uma bicamada lipídica sentem um potencial restaurador que restringe a amplitude de seu movimento rotacional. A tendência do marcador em se ordenar em um meio com ordenamento molecular microscópico pode ser modelada por um potencial de orientação $U(\Omega)$, onde Ω representa os ângulos de Euler dos eixos de difusão no sistema de coordenadas diretor. Este potencial também produz uma distribuição orientacional de moléculas em torno do eixo de ordenamento local da membrana.

Figura 11. Representação esquemática de alguns eixos dos sistemas de coordenadas do marcador de spin 16-PCSL em membranas lipídicas. O eixo z_d é o diretor local da membrana, z_R é o eixo de simetria da cadeia acila e, neste caso, é paralelo ao diretor local, $R_{||}$ e $R_{\perp}$ são os valores principais do tensor de difusão, θ é o ângulo de inclinação da cadeia acila relativo ao eixo z_R e está relacionado com o parâmetro de ordem e x_m , y_m e z_m são os eixos magnéticos do radical nitróxido.

Em sua forma mais geral, a função potencial $U(\Omega)$ pode ser expandida em uma série das funções de rotação de Wigner, ou harmônicos esféricos generalizados, $D_{K,M}^L(\Omega)$:

$$U(\Omega) = -k_B T \sum_{L,K,M} \varepsilon_{KM}^L D_{K,M}^L(\Omega)$$

onde k_B é a constante de Boltzmann e T a temperatura absoluta do sistema. Usando as hipóteses de simetria cilíndrica em torno do eixo diretor $\mathbf{z}_d$ (92, 93) e impondo a propriedade de uniaxialidade do sistema, a equação acima pode ser reescrita como:

$$U(\theta, \phi) = -k_B T \sum_{\substack{0 < L, K \leq 4 \\ L, K \text{ pares}}} c_{LK} (D_{K,0}^L(\theta, \phi) + D_{-K,0}^L(\theta, \phi))$$

onde a somatória se restringe a L e K pares, menores ou iguais a 4. Explicitamente, a expansão acima pode ser escrita como:

$$\begin{aligned} -\frac{U(\theta, \phi)}{k_B T} = & c_{20} \left(\frac{3 \cos^2 \theta - 1}{2} \right) + c_{22} \sqrt{\frac{3}{2}} \sin^2 \theta \cos 2\phi + c_{40} \left(\frac{35 \cos^4 \theta - 30 \cos^2 \theta + 3}{8} \right) + \\ & + c_{42} \sqrt{\frac{5}{8}} (7 \cos^2 \theta - 1) \sin^2 \theta \cos 2\phi + c_{44} \sqrt{\frac{35}{32}} \sin^4 \theta \cos 4\phi \end{aligned}$$

e os coeficientes adimensionais c_{LK} são os parâmetros a serem minimizados no processo de simulação.

A mobilidade de um marcador de spin em um sistema anisotrópico tal como membranas lipídicas pode ser modelada como uma difusão rotacional browniana na presença deste potencial restaurador $U(\Omega)$. Com isso, o tensor de relaxação deve conter um termo oriundo deste potencial de orientação (94-96):

$$\Gamma_{\Omega} = \zeta \cdot \mathbf{R} \cdot \zeta + \zeta \cdot \mathbf{R} \cdot \frac{\zeta U(\Omega)}{k_B T}$$

Nesta última expressão, ζ é um operador vetorial gerador de rotações infinitesimais e é identificado como o operador momento angular e $\mathbf{R}$ o tensor de difusão rotacional da molécula considerada.

Usualmente, alguns parâmetros são usados para expressar o ordenamento microscópico local de lipídios em membranas macroscopicamente desordenadas. O parâmetro de ordem mais comumente usado, S_0 , que representa a amplitude angular do radical nitróxido com relação ao diretor local, é definido como:

$$S_0 = \langle D_{00}^2 \rangle = \left\langle \frac{3 \cos^2 \theta - 1}{2} \right\rangle = \frac{\int d\Omega D_{00}^2 \exp\left(-U/k_B T\right)}{\int d\Omega \exp\left(-U/k_B T\right)}$$

Um segundo parâmetro de ordem tipicamente usado e que representa o desvio da simetria cilíndrica do alinhamento molecular relativo ao diretor local (vetor normal à bicamada) é definido de uma maneira similar como:

$$S_2 = \langle D_{02}^2 + D_{0-2}^2 \rangle = \left\langle \sqrt{\frac{3}{2}} \sin^2 \theta \cos(2\phi) \right\rangle$$

No processo de simulação de espectros de vesículas lipídicas, o programa NLSL ainda permite levar em consideração o caso onde há domínios na membrana com ordenamento local, descritos pelo potencial de restauração $U(\Omega)$, mas que, globalmente, estão orientados aleatoriamente, ou seja, os vetores diretores de cada segmento estão isotropicamente distribuídos de tal forma que não há ordem macroscópica. Este é o chamado efeito MOMD (*Microscopic Order with Macroscopic Disorder*) introduzido por Meirovitch *et. al.* (97). O espectro final é então representado como uma superposição de espectros oriundos de todos os fragmentos da membrana. Isto é modelado por integração da linha espectral sobre todos os ângulos de *tilt* Ψ (Figura 12) do vetor diretor local em relação à direção do campo magnético estático (eixo $\mathbf{z}_L$):

$$S_i^{MOMD} = \int S_i(\psi) \sin \psi \, d\psi$$

Para efeitos práticos, em todas as simulações apresentadas neste trabalho, o espectro teórico final foi obtido pela média de vinte e três valores diferentes de Ψ .

Por fim, o programa ainda permite a implementação de larguras de linha gaussianas e lorentziana adicionais relacionadas a não homogeneidades locais oriundas de campos magnéticos produzidos pela amostra e do campo magnético externo gerado pelo equipamento. Há duas contribuições isotrópicas, ou seja, que afetam igualmente todas as orientações, e duas anisotrópicas, que alargam seletivamente as linhas do espectro de RPE.

Figura 12. Representação esquemática de um domínio de membrana que apresenta ordenamento molecular microscópico (ampliação de uma seção da bicamada à direita), mas que, globalmente, está orientado aleatoriamente com relação ao eixo z_L do laboratório. Nesta figura também é apresentada a definição do ângulo de *tilt* Ψ , que é o ângulo entre o diretor local de cada domínio e o eixo de aplicação do campo magnético externo. (Figura adaptada das referências (80, 98))

CAPÍTULO 3

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo apresentamos os resultados experimentais obtidos a partir das medidas de DSC e RPE da interação dos fármacos antimaláricos primaquina e cloroquina com modelos de membranas constituídas de fosfolipídios de DMPC. Primeiramente, são discutidos os efeitos de ambos os fármacos no comportamento termotrópico das vesículas de DMPC usando os resultados provenientes dos estudos calorimétricos. Em seguida, apresentamos os resultados oriundos do estudo espectroscópico, analisando os espectros de RPE através de parâmetros empíricos e de simulação computacional. Por fim, é realizada uma discussão geral sobre os efeitos causados pelos fármacos na estrutura e dinâmica das membranas, correlacionando com dados da literatura.

3.1 Análise Calorimétrica

Com o objetivo de examinar a interação dos fármacos com bicamadas lipídicas, o comportamento de fase de vesículas lipídicas na ausência e na presença da cloroquina (CQ) e da primaquina (PQ) foi determinado. A Figura 13 mostra os termogramas das vesículas multilamelares de DMPC e os efeitos das moléculas de CQ e PQ no comportamento termotrópico das mesmas em tampão na ausência e na presença de sal. Na ausência dos fármacos e em baixa força iônica (tampão sem sal), um lipídio como o DMPC exibe dois eventos endotérmicos quando é aquecido. Na temperatura de 13,7(4)°C é observada uma transição de fase menos energética e menos cooperativa, denominada de pré-transição, surgida da conversão da fase gel lamelar $L_{\beta'}$ para a fase gel *ripple* $P_{\beta'}$ (evento 1 da Figura 14). Uma segunda transição, mais energética e apresentando uma maior cooperação intermolecular entre os fosfolipídios das vesículas de DMPC, denominada de transição principal, surge da conversão da fase $P_{\beta'}$ para fase lamelar líquido-cristalino L_{α} (evento 2 da Figura 14) e é exibida na temperatura de 23,83(2)°C, concordando, em boa aproximação, com dados da literatura (99, 100). Todos os dados termodinâmicos referentes a ambas as transições na ausência e na presença dos fármacos e em baixa e alta força iônica estão apresentados na Tabela 1.

Mudança estrutural das bicamadas causada por agentes externos pode levar a deslocamentos na temperatura de transição de fase dos lipídios devido a mudanças na entropia da transição entre os estados do sistema e/ou alargamento da curva de DSC devido à diminuição da cooperatividade da transição (101). É bem conhecido que alterações do empacotamento lipídico das bicamadas levam a mudanças no comportamento termotrópico de lipossomos (101). Quando o ordenamento molecular microscópico é perturbado de tal maneira a diminuir o empacotamento

Figura 13. Termogramas de DSC ilustrando o efeito dos fármacos antimaláricos no comportamento termotrópico de vesículas de DMPC em tampão 50 mM Tris/HCl, pH 7,5 na ausência (inserção à direita) e na presença de 150 mM de NaCl e 5 mM de CaCl_2 .

global de uma determinada fase, a variação de entropia entre esta fase do sistema e a adjacente aumenta, deslocando a temperatura característica de transição entre estes estados para valores menores. A incorporação de PQ nas vesículas de DMPC é capaz de induzir algumas mudanças no perfil termotrópico destes lipídios. É observada uma diminuição da cooperatividade da transição principal, corroborado pelo alargamento do termograma na transição, e um deslocamento da temperatura de transição de fase principal dos lipídios para valores menores (Figura 13). Este fármaco produz, por conseguinte, uma desestabilização da fase $P_{\beta'}$. Contudo, apenas um leve aumento na variação de entropia entre as fases $P_{\beta'}$ e L_{α} do sistema é observado (Tabela 1). Além daqueles efeitos, as moléculas de primaquina são capazes de abolir a pré-transição das vesículas

lipídicas. Isto é um indicativo de forte interação entre este fármaco e as membranas constituídas por fosfolipídios de DMPC.

Figura 14. Transições de fase de vesículas lipídicas de DMPC. O evento 1 refere-se à chamada pré-transição, surgida da conversão da fase gel *tilted* ($L_{\beta'}$) para a fase gel *ripple* ($P_{\beta'}$) e o evento 2, denominado de transição principal, surge da conversão da fase $P_{\beta'}$ para a fase líquido-cristalina (L_{α}). Figura adaptada da referência (102) e do website da Avanti Polar Lipids (<http://www.avantilipids.com/>).

Tabela 1. Dados termodinâmicos obtidos da análise dos termogramas de DSC da pré-transição e da transição principal das vesículas de DMPC na ausência e na presença dos fármacos antimaláricos e em baixa e alta força iônica.

Tampão 50 mM Tris/HCl; pH 7,5

Pré-transição			Transição principal				
Amostra	T_P (°C)	ΔH_P (Kcal/mol)	T_M (°C)	ΔH_{cal} (Kcal/mol)	ΔH_{VH} (Kcal/mol)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)	ΔS (cal/mol.K)
DMPC puro	13,7 (4)	0,35 (5)	23,83 (2)	4,4 (3)	2223 (1)	0,58 (3)	15 (1)
DMPC / CQ	13,0 (4)	0,18 (5)	23,79 (2)	4,8 (4)	2219 (1)	1,02 (4)	16 (1)
DMPC / PQ	-	-	22,00 (3)	5,2 (4)	2192 (1)	1,00 (4)	18 (1)

Tampão 50 mM Tris/HCl com 150 mM de NaCl e 5 mM de CaCl₂; pH 7,5

DMPC puro	14,0 (4)	0,23 (6)	24,36 (2)	4,6 (3)	2231 (1)	0,50 (3)	15 (1)
DMPC / CQ	13,9 (5)	0,18 (5)	24,32 (2)	4,5 (4)	2229 (1)	0,73 (4)	15 (1)
DMPC / PQ	-	-	22,14 (3)	4,6 (4)	2194 (1)	1,05 (7)	16 (1)

Observações:

- 1) Os valores das entalpias calorimétrica (ΔH_{cal}) e de van't Hoff (ΔH_{VH}) e da entropia (ΔS) da transição foram calculados de acordo com as equações desenvolvidas na seção 2.5.1;
- 2) Os números entre parênteses ao lado dos valores de cada parâmetro representam a maior diferença encontrada (no último algarismo significativo) entre os valores das medidas de cada parâmetro com o valor médio de três medidas distintas.

Por outro lado, o termograma das vesículas de DMPC com a incorporação da CQ não exibe mudanças significativas. A cloroquina não é eficaz na redução da temperatura de transição de fase principal de forma acentuada e não é capaz de abolir a pré-transição. Todavia, o termograma exibe uma diminuição da cooperatividade da transição principal, corroborado pelo aumento da largura desta transição nos termogramas da Figura 13, e uma leve diminuição na temperatura de ambas as transições. Estes dados indicam que a CQ não perturba fortemente a organização das cadeias acila indicando ou penetração parcial da mesma na bicamada ou que pequena quantidade dela se insere na região hidrofóbica das vesículas lipídicas, com os fármacos agindo como “impurezas” na fase gel da bicamada (103).

Como apresentado na Tabela 1, quando as vesículas lipídicas estão suspensas em tampão com maior concentração de sal, as temperaturas de ambas as transições de fase do DMPC aumentam. Isto é um forte indicativo de uma maior estabilização das fases gel da bicamada. Há uma mudança de 0,3°C na temperatura da pré-transição e de 0,53°C na temperatura da transição principal. Provavelmente este fato está relacionado com uma blindagem das cargas parciais da cabeça polar da fosfatidilcolina pelos íons presentes no solvente. Este mesmo efeito é observado, por exemplo, quando cátions são inseridos em um solvente e interagem com um lipídio aniônico tal como a fosfatidilserina (104). Provavelmente, os cátions Na^+ e Ca^{+2} e o ânion Cl^- do tampão salino devem solvatar as cargas da cabeça polar zwitteriônica do DMPC, provocando uma redução da repulsão eletrostática entre as cabeças polares dos fosfolipídios, aumentando, consequentemente, o empacotamento das cadeias. Por conseguinte, o aumento das interações hidrofóbicas entre as cadeias acila pode levar a um aumento na cooperatividade da transição e estabilização da fase gel da bicamada. E é exatamente isto que é observado nos termogramas apresentados na Figura 13 e mais facilmente visualizado na Tabela 1. O leve aumento na cooperatividade é observado com a diminuição do parâmetro $\Delta T_{1/2}$ ($0,58 \rightarrow 0,50$). Este efeito é

mais proeminente na presença da CQ ($\Delta T_{1/2}$ diminui de 1,02 para 0,73). E parece não haver diferenças na cooperatividade da transição com a incorporação da PQ. Este fato provavelmente pode ser atribuído à maior capacidade de penetração da primaquina no interior hidrofóbico da bicamada, independente da presença ou não de sais no solvente.

Pode ser notado ainda que, apesar das temperaturas da transição principal serem deslocadas para valores maiores na presença do sal, o efeito da primaquina sobre as vesículas de DMPC é maior quando íons estão presentes na solução. Foi observada uma variação da T_M das membranas com a PQ incorporada com relação ao lipídio puro de 1,83(5)°C em tampão sem sal e 2,22(5)°C em tampão salino. Isto é um indicativo de maior interação deste fármaco com o DMPC em alta força iônica. A presença de íons parece não afetar o efeito da cloroquina sobre a T_M das vesículas de DMPC.

As variações similares na temperatura de transição principal e na entalpia de van't Hoff de ambos os conjuntos de dados (tampão na ausência e na presença de 150 mM de NaCl e 5 mM de CaCl_2) para cada amostra, indicam que a forma da transição não se modifica com a presença dos sais e que o efeito de ambas as moléculas sobre a estrutura e dinâmica das cadeias lipídicas é o mesmo. Com exceção feita à primaquina que tem seu efeito levemente aumentado na presença dos sais. Os valores da entalpia calorimétrica, em contrapartida, estão sujeitos a maiores erros devido à sua forma de obtenção. Conforme seção 2.5.1, a determinação dos mesmos é realizada a partir de integração dos termogramas. Entretanto, os valores são altamente dependentes da subtração da linha de base. Além disso, incertezas na concentração dos lipídios na amostra levam a erros na normalização dos termogramas e, por conseguinte, valores incertos da entalpia calorimétrica. Com isso, os valores obtidos para este parâmetro devem ser analisados com mais cautela. Em tampão com mais alta força iônica, a entalpia calorimétrica da transição principal não se modifica significativamente na presença dos fármacos. Isto levou a um leve aumento na

variação da entropia da transição com a presença da PQ. Por outro lado, em tampão com menor força iônica, foram observadas mudanças levemente maiores na entalpia calorimétrica, provocando um aumento da variação de entropia da transição principal mais proeminente. Essas diferenças na variação de entropia encontradas na ausência e na presença de sais podem ser aparentes, provavelmente provocada por uma determinação imprecisa da entalpia calorimétrica.

3.2 Análise Convencional dos Espectros de RPE

Nesta seção apresentamos os resultados referentes à análise convencional dos espectros de RPE baseadas em parâmetros empíricos definidos sobre o próprio espectro. Nas subseções seguintes são apresentados os espectros dos marcadores de spin que evidenciam a interação dos fármacos antimaláricos com as vesículas de DMPC e discutidos os efeitos dos mesmos em cada região lipídica separadamente. Dos estudos calorimétricos, vimos que o efeito global de ambos os fármacos sobre as membranas é análogo na ausência ou na presença de sais em solução. Há apenas um aumento da interação da primaquina com as bicamadas lipídicas na presença de sal. Em vista disso, foi utilizado o tampão com **maior** força iônica para os estudos por RPE.

3.2.1 Marcador de Spin 5-PCSL

Em toda a discussão nesta e nas seções dedicadas à análise das interações pelos experimentos de RPE, apesar de não estar totalmente incorreto, fizemos um abuso de linguagem atribuindo todo o comportamento do sistema abaixo da transição de fase principal das vesículas de DMPC à fase gel. Isto foi feito devido à insensibilidade da técnica de RPE em monitorar a pré-transição.

Na Figura 15 são apresentados os espectros de RPE do marcador de spin 5-PCSL nas fases gel e líquido-cristalino das vesículas de DMPC, na ausência e na presença dos fármacos antimaláricos. Nos espectros à 20°C, a diminuição do desdobramento hiperfino máximo e a diferença na intensidade da linha indicada pela seta nesta figura sugerem que a PQ aumenta a mobilidade dos marcadores de spin, reduzindo o empacotamento da membrana. O desdobramento hiperfino máximo é um parâmetro empírico que contém contribuições da amplitude e da dinâmica do movimento das cadeias dos marcadores de spin (82). Quando a organização da região monitorada pelo marcador diminui ou quando a dinâmica das cadeias lipídicas nesta região aumenta, o valor deste parâmetro decresce. Como não houve alteração observável neste parâmetro e na forma da linha ao incorporar a cloroquina à bicamada nesta temperatura, o efeito desta molécula na dinâmica e ordenamento lipídico pode ser considerado desprezível nesta região.

Uma simples observação dos espectros na fase fluida (Figura 15, coluna à direita) não evidencia nenhuma variação significativa na forma dos mesmos quando os fármacos são adicionados, ou seja, a única hipótese que pode ser levantada, em princípio, é que o efeito destas

moléculas sobre a estrutura e dinâmica da região próxima à cabeça polar dos fosfolípidios nesta fase é desprezível.

Figura 15. Espectros de RPE do marcador de spin 5-PCSL em dispersões lipídicas de DMPC, sem e com a adição dos fármacos antimaláricos em duas diferentes temperaturas, 20 e 35 °C. As linhas pontilhadas são guias para ajudar na percepção das mudanças espectrais. A seta indica uma mudança na forma da linha espectral com a adição da primaquina comparada ao espectro do lipídio puro. A largura total dos espectros é de 100 G.

Para investigar quantitativamente o sistema em estudo e procurar por mais detalhes que visualmente são difíceis de serem observados, apresentamos na Figura 16 a variação com a temperatura do desdobramento hiperfino máximo e do parâmetro de ordem efetivo calculado segundo a equação apresentada na seção 2.6.1. Este último parâmetro contém contribuições da amplitude e da dinâmica do movimento das cadeias dos marcadores de spin, sendo, portanto, similar ao A_{MAX} . Entretanto, a principal contribuição ao parâmetro de ordem efetivo é a

amplitude do movimento segmental das cadeias acila (105). Além disso, este parâmetro contabiliza o efeito das distintas polaridades das microrregiões nos quais os marcadores estão inseridos (86). Ambos os parâmetros decrescem com o aumento da dinâmica das cadeias lipídicas ou com a diminuição do ordenamento das mesmas na região monitorada pelo marcador. A variação abrupta dos dados experimentais destes parâmetros em torno de 23°C indica a transição de fase.

A Figura 16 mostra que ambas as moléculas não provocam efeito significativo nas fases gel *tilted* e fluida da membrana. Entretanto, a fase gel *ripple* (intervalo de temperaturas entre 14 e 23°C) é fortemente perturbada pela presença da primaquina. A diminuição do parâmetro de ordem efetivo é um indicativo de aumento da dinâmica e/ou diminuição do empacotamento lipídico naquela região. A determinação dos valores de S_{EFF} das medidas abaixo de 15°C não foi possível, em vista da dificuldade na determinação do desdobramento hiperfino mínimo (conforme Figura 10B da seção 2.6.1). A dependência com a temperatura dos valores de A_{MAX} sugere que a primaquina pode ser capaz de reduzir a T_M das vesículas de DMPC. Contudo, cabe aqui mencionar que os marcadores de spin 5-PCSL não são os mais apropriados para monitorar transições de fase lipídicas. Com isso, inferências realizadas a partir de modificações na dependência do A_{MAX} com a temperatura para estes marcadores devem ser tomados apenas como indicativos. Neste sentido, a suavidade da curva na transição pode ser um indício de diminuição da cooperatividade entre os fosfolipídios nas vesículas, visto que o empacotamento dos mesmos é reduzido na presença da PQ. A desestabilização da fase gel *ripple* na presença da primaquina está em pleno acordo com a análise calorimétrica realizada previamente.

Figura 16. Dependência com a temperatura do desdobramento hiperfino máximo e do parâmetro de ordem efetivo (inserção à direita) do marcador de spin 5-PCSL incorporado em vesículas de DMPC, sem e com a adição dos fármacos antimaláricos.

No caso das moléculas de CQ, nenhum efeito significativo sobre a dinâmica e ordenamento lipídicos foi observado. A única mudança percebida em todo intervalo de temperatura foi detectada no espectro medido em 23°C. A diminuição de ambos os parâmetros (A_{MAX} e S_{EFF}) nesta temperatura pode ser um indicativo de uma redução da cooperatividade da transição, como foi observado nos estudos calorimétricos.

3.2.2 Marcador de Spin 7-PCSL

Na Figura 17 são apresentados os espectros de RPE do marcador de spin 7-PCSL nas fases gel e líquido-cristalino das vesículas lipídicas de DMPC, na ausência e na presença dos fármacos antimaláricos. Nota-se novamente que, na fase fluida da membrana, os espectros não apresentam diferenças marcantes sendo, portanto, um indicativo de que, na região monitorada por este marcador, as alterações induzidas pelos fármacos são desprezíveis. Entretanto, em 20°C, a diminuição do desdobramento hiperfino máximo e a diferença na intensidade da linha indicada pelas setas nesta figura sugerem que ambos os fármacos aumentam a mobilidade das cadeias acila dos marcadores em DMPC e reduzem o empacotamento da membrana, como observado anteriormente nos espectros do marcador 5-PCSL na presença de PQ, nesta mesma temperatura. A cloroquina causa pequena perturbação na região monitorada pelo 7-PCSL se comparado com o efeito provocado pela PQ, sendo consistente em **magnitude**, portanto, com os estudos calorimétricos.

Para evidenciar o efeito dessas moléculas em ambas as fases do DMPC, apresentamos na Figura 18 a variação com a temperatura do desdobramento hiperfino máximo e do parâmetro de ordem efetivo. A variação de A_{MAX} com a temperatura sugere que ambas as moléculas deslocam a temperatura de transição de fase lipídica para valores menores. Os estudos por DSC mostraram, contudo, que a CQ não é capaz de promover a transição de fase do DMPC em temperaturas inferiores à do lipídio puro. Esta aparente contradição nos resultados pode ser explicada pelo simples fato de que RPE não é a técnica mais indicada para se determinar com precisão temperaturas de transição de fase e que esse parâmetro empírico não é o mais apropriado para estudos específicos de transição de fase lipídica. Conforme mencionado na seção 2.6.1, a

transição principal é mais abrupta quando monitorada por marcadores de spin próximos ao centro da bicamada. Para as moléculas de CQ, as mudanças nos valores de A_{MAX} e S_{EFF} em torno da transição de fase lipídica devem ser tomadas apenas como indicativo de redução do empacotamento e/ou aumento da dinâmica lipídica da região monitorada pelo 7-PCSL.

Figura 17. Espectros de RPE do marcador de spin 7-PCSL em dispersões lipídicas de DMPC, sem e com a adição dos fármacos antimaláricos em duas diferentes temperaturas, 20 e 35 °C. As linhas pontilhadas são guias para ajudar na percepção das mudanças espectrais. As setas indicam mudanças na forma da linha provocadas pela incorporação de ambos os fármacos. A largura total dos espectros é de 100 G.

No caso da primaquina em DMPC, a suavidade das curvas em função da temperatura parece indicar que este fármaco acaba por abolir, ou diminuir fortemente, a transição de fase do fosfolípido (Figura 18), o que está em contraste com os estudos calorimétricos (Figura 13). Assim, devemos tomar esses resultados apenas como indicativo de redução do ordenamento

lipídico na fase gel *ripple* da bicamada e/ou aumento da mobilidade das cadeias acila. Novamente, ambos os gráficos mostram que este efeito é mais proeminente com a incorporação da PQ.

Portanto, o efeito dos fármacos é de aumentar a fluidez da membrana e reduzir o empacotamento da mesma na região monitorada pelo marcador de spin 7-PCSL, sendo que este efeito se estende sobre toda a fase gel *ripple* com a adição da primaquina, e restringe-se a temperaturas bem próximas (por valores menores) à transição principal com a incorporação da cloroquina.

Figura 18. Dependência com a temperatura do desdobramento hiperfino máximo e do parâmetro de ordem efetivo (inserção à direita) do marcador de spin 7-PCSL incorporado em vesículas de DMPC, sem e com a adição dos fármacos antimaláricos.

3.2.3 Marcador de Spin 16-PCSL

Na Figura 19 são apresentados os espectros de RPE do marcador de spin 16-PCSL nas fases gel e fluida das vesículas de DMPC, com e sem adição dos fármacos. Nos espectros apresentados é possível observar uma considerável mudança com a adição de PQ à membrana de DMPC à 20°C. Note que o espectro torna-se mais “isotrópico”, evidenciado pelo estreitamento das linhas, o que reflete um ambiente mais fluido do marcador. Isto sugere uma possível mudança da temperatura de transição da fase gel para a fase fluida dos lipídios, como foi evidenciado pelos estudos de DSC. Por outro lado, a adição de CQ parece não promover o mesmo efeito. Não houve alteração observável ao incorporar este fármaco à bicamada. Também podemos notar que uma simples observação dos espectros na fase fluida (35°C) não atesta nenhuma variação significativa quando os fármacos são adicionados (Figura 19, coluna à direita), ou seja, parece não haver nenhum efeito de qualquer destas moléculas sobre a estrutura e dinâmica dos fosfolipídios nesta fase, o que está de acordo com os resultados obtidos com os outros marcadores.

Para evidenciar os efeitos dos fármacos sobre a dinâmica e ordenamento lipídicos em ambas as fases, uma análise da dependência com a temperatura dos parâmetros h_{+1}/h_0 e h_{-1}/h_0 (definidos na Figura 10A, seção 2.6.1) pode nos fornecer informações não observáveis diretamente dos espectros. Na Figura 20 é apresentada a variação da razão h_{+1}/h_0 com a temperatura para os espectros do marcador 16-PCSL, com e sem adição da primaquina e da cloroquina. A variação abrupta deste parâmetro em torno de 23°C na ausência dos fármacos indica a transição entre as fases gel e fluida do DMPC. Podemos observar que as moléculas de CQ não promovem mudança no valor desta temperatura de transição. Na fase gel, há uma

pequena diminuição do valor da razão h_{+1}/h_0 , o que poderia indicar um leve enrijecimento na estrutura dos lipídios. Entretanto, esta variação, não muito significativa e dentro da margem de erro dos valores do lipídio puro, não nos permite corroborar tal asserção. Portanto, a única hipótese que podemos levantar sobre a interação da cloroquina com os lipídios de DMPC, baseada exclusivamente nos estudos de RPE, é que este fármaco promove pouco ou nenhum efeito sobre a região próxima ao centro bicamada lipídica. Esta suposição encontra fundamentos se levarmos em consideração os resultados provenientes dos estudos por DSC.

Figura 19. Espectros de RPE do marcador de spin 16-PCSL em dispersões lipídicas de DMPC, sem e com a adição dos fármacos antimaláricos em duas temperaturas, 20 e 35 °C. A largura total dos espectros é de 100 G.

Por outro lado, a notável mudança na dependência com a temperatura do parâmetro h_{+1}/h_0 com a inserção de PQ comparado ao do lipídio puro (Figura 20) nos permite inferir que este fármaco perturba fortemente a fase gel das membranas e possui uma grande capacidade de

penetração na bicamada. Estas asserções são fundamentadas, respectivamente, no grande deslocamento da T_M dos lipídios e no possível enrijecimento da estrutura das membranas na fase gel *tilted*, evidenciado na Figura 20 pela diminuição considerável dos valores de h_{+1}/h_0 . Conforme mencionado na seção 2.6.1, quando o valor deste parâmetro se aproxima da unidade, o ambiente em torno do marcador apresenta uma maior fluidez. Portanto, a redução do mesmo é um indicativo de diminuição da mobilidade experimentada pelo marcador de spin e/ou um aumento no empacotamento da membrana. Para esta análise, foram considerados apenas os dois primeiros pontos dos dados da primaquina em DMPC, ou seja, as temperaturas de 6 e 10°C. Para temperaturas acima de aproximadamente 12°C, começa a haver uma mudança muito grande na dinâmica e no empacotamento das cadeias lipídicas. Adicionalmente a estes resultados, a suavidade da forma da curva na transição é um indicativo de redução na cooperatividade entre as cadeias dos fosfolipídios, estando de acordo com os estudos calorimétricos.

O melhor parâmetro para investigar possíveis mudanças na fase fluida dos lipídios pela adição de moléculas interagentes é a razão h_{-1}/h_0 entre as linhas de campos alto e central, devido à maior sensibilidade deste parâmetro com relação à razão h_{+1}/h_0 nesta fase lipídica. Uma inserção na Figura 20 apresenta a variação do parâmetro h_{-1}/h_0 com a temperatura. Observe que nenhum efeito é causado na fase fluida do DMPC pela introdução destes fármacos, consistente com os resultados obtidos anteriormente.

Figura 20. Dependência dos parâmetros h_{+1}/h_0 e h_{-1}/h_0 (inserção, fase fluida apenas) com a temperatura do marcador de spin 16-PCSL em DMPC, sem e com a adição dos fármacos antimaláricos.

3.2.4 Região Intermediária

Com o intuito de investigarmos as mudanças provocadas pelos fármacos antimaláricos ao longo de toda a cadeia lipídica do DMPC, espectros de RPE dos marcadores de spin 10-, 12- e 14-PCSL incorporados à bicamada na ausência e na presença dos fármacos foram obtidos. A Figura 21 mostra o efeito das moléculas de CQ e PQ na fase gel do lipídio (20°C). Nos espectros apresentados, é possível observar, novamente, uma considerável mudança na forma da linha com a adição da PQ à membrana nas três regiões monitoradas pelos marcadores e uma redução do

desdobramento hiperfino máximo. Igualmente ao efeito desta molécula nos espectros dos outros marcadores, o estreitamento das linhas e a redução do A_{MAX} com a inserção da PQ refletem um ambiente mais fluido do marcador. Em contrapartida, não houve alteração observável ao se incorporar moléculas de CQ à bicamada nesta temperatura, esta não sendo capaz, portanto, de modificar a dinâmica e estrutura das cadeias lipídicas nestas regiões.

Figura 21. Espectros de RPE dos marcadores de spin 10-, 12- e 14-PCSL na fase gel (20 °C) de dispersões lipídicas de DMPC, sem e com a adição dos fármacos antimaláricos. As linhas pontilhadas representam a separação hiperfina máxima e as setas nos espectros do marcador 14-PCSL evidenciam uma segunda componente. A largura total dos espectros é de 100 G.

Pode ser observado na Figura 21, que o sinal do marcador 14-PCSL em bicamadas de DMPC produz espectros de RPE com duas componentes. Isto pode ser interpretado como uma composição de espectros oriundos de dois micro-domínios da bicamada estruturalmente

diferentes sentidos pelos marcadores de spin. Uma destas componentes espectrais tem um desdobramento hiperfino mais estreito e representa marcadores em um ambiente com maior mobilidade. Com um desdobramento hiperfino maior (evidenciado pela seta na Figura 21), a segunda componente é proveniente de marcadores cujo movimento das cadeias é mais restrito.

Os espectros de duas componentes foram observados somente na fase *gel ripple* das vesículas de DMPC. Pode ser notado na Figura 21 que a CQ não muda a característica de duas componentes do espectro e, conseqüentemente, não perturba significativamente o movimento das cadeias lipídicas nesta região. Em contrapartida, a incorporação da primaquina produz um espectro típico de uma única componente, como o encontrado para este mesmo marcador inserido no lipídio puro na fase fluida (Figura 22). Isto é mais uma evidência de possível desestabilização da fase *gel ripple* das vesículas de DMPC e redução da temperatura de transição de fase proporcionadas pela introdução da PQ. Uma discussão mais detalhada desta segunda componente, bem com a simulação espectral em todo o intervalo de temperatura são apresentadas na seção 3.3.2.

Os espectros de RPE de todas as amostras na fase fluida da membrana (Figura 22) não apresentam variações significativas na forma da linha. A dependência com a temperatura do parâmetro h_{-1}/h_0 , útil para investigarmos os efeitos dos fármacos na fase fluida, para os marcadores 12- e 14-PCSL (gráfico não apresentado) é análoga à encontrada para o marcador de spin 16-PCSL (inserção da Figura 20). Ou seja, não há qualquer efeito dos fármacos na fase líquido-cristalino da membrana, consistente, portanto, com os resultados obtidos com os outros marcadores de spin.

Figura 22. Espectros de RPE dos marcadores de spin 10-, 12- e 14-PCSL na fase fluida (35 °C) de dispersões lipídicas de DMPC, sem e com a adição dos fármacos antimaláricos. A largura total dos espectros é de 100 G.

Na Figura 23 apresentamos a variação do desdobramento hiperfino máximo dos marcadores 10- e 12-PCSL na fase gel dos lipídios na presença e na ausência dos fármacos antimaláricos. Igualmente aos resultados obtidos com os outros marcadores, a cloroquina não é capaz de perturbar a dinâmica e ordenamento dos lipídios, enquanto que a primaquina aumenta o movimento das cadeias lipídicas e/ou diminui o empacotamento da membrana na fase gel *ripple*, evidenciado nos gráficos pela redução dos valores de A_{MAX} . (intervalo de temperatura entre 15 e 20°C).

Figura 23. Variação do desdobramento hiperfino máximo com a temperatura dos marcadores de spin (a) 10- e (b) 12-PCSL na fase gel das vesículas de DMPC, sem e com a adição dos fármacos antimaláricos.

3.3 Simulações Espectrais

No intuito de obtermos informações quantitativas mais detalhadas acerca da estrutura e dinâmica das cadeias acila, alguns espectros de RPE foram selecionados e simulados. Usando valores de entrada de alguns parâmetros definidos pelo usuário e fazendo uso de cálculos numéricos, o programa de simulação NLSL desenvolvido por Freed e colaboradores (69) produz um espectro de RPE a partir da solução da equação estocástica de Liouville (seção 2.6.2). O processo de simulação do espectro experimental é realizado usando um algoritmo de minimização de mínimos quadrados não-linear. Todos os detalhes deste programa foram extensivamente discutidos nos artigos citados na seção 2.6.2.

Os parâmetros envolvidos no procedimento de simulação foram os seguintes: as componentes principais dos tensores hiperfino (A_{xx} , A_{yy} , A_{zz}) e giromagnético (g_{xx} , g_{yy} , g_{zz}), os coeficientes do potencial de orientação (c_{20} , c_{22} e c_{40}) que dão informações sobre o ordenamento molecular dos lipídios e as componentes principais dos tensores de difusão rotacional ($R_{\perp}$, $R_{\parallel}$) e largura de linha lorentziana anisotrópica ($W_{\perp}$, $W_{\parallel}$), estes dois últimos escritos em uma simetria axial. Além disso, uma largura de linha gaussiana homogênea adicional, por vezes, foi utilizada nas simulações. Cabe ressaltar que alguns desses parâmetros são usualmente mantidos constantes durante o processo de ajuste, ao passo que outros sofrem variação de forma a se obter o melhor espectro teórico a partir dos métodos de minimização empregados pelo pacote NLSL.

A dinâmica do marcador de spin é descrita através de taxas de difusão rotacional, $R_{\parallel}$ e $R_{\perp}$, do radical nitróxido em torno dos eixos paralelo e perpendicular, respectivamente, ao eixo médio de simetria para a rotação. Como pode ser visualizado na Figura 11, este eixo de simetria,

eixo z_R do sistema de difusão rotacional, é também a direção de orientação preferencial dos marcadores de spin (67). Estas taxas constituem, na realidade, aproximações dos modos internos de rotação e do movimento geral das cadeias lipídicas (106).

Os valores de entrada dos tensores magnéticos $\vec{g}$ e $\vec{A}$ foram obtidos de Earle *et. al.* (107). Neste artigo, os parâmetros magnéticos dos marcadores 5-, 7-, 12- e 16-PCSL em DPPC foram determinados a partir dos espectros de RPE no limite rígido e na frequência de 250-GHz. Como a cadeia lipídica do DPPC é idêntica à do DMPC a menos de dois carbonos, os parâmetros obtidos naquele trabalho foram utilizados como valores de entrada no processo de simulação. Os parâmetros magnéticos dos marcadores 10- e 14-PCSL foram obtidos, inicialmente, como valores intermediários àqueles dos outros marcadores. Este procedimento foi adotado devido à falta de dados tabelados na literatura dos valores dos tensores magnéticos dos marcadores n-PCSL em DMPC.

A estratégia de simulação foi a seguinte: para cada marcador de spin em DMPC puro, os parâmetros magnéticos foram mantidos inicialmente constantes e os coeficientes do potencial de orientação e os parâmetros dinâmicos foram variados. Isto foi feito até a obtenção dos melhores espectros teóricos gerados com estes parâmetros magnéticos. Depois disso, permitiu-se que os valores dos tensores magnéticos fossem levemente variados. Contudo, quando estes parâmetros são todos variados juntos, alta correlação entre eles pode surgir. Consequentemente, para evitar esse tipo de situação, as variações dos parâmetros associados aos tensores $\vec{g}$ e $\vec{A}$ foram realizadas separadamente. Os parâmetros da simulação obtidos dos espectros das amostras-controle (DMPC/n-PCSL) foram usados como valores de entrada para as simulações das amostras com os fármacos incorporados. Nestas amostras e em todas as temperaturas, os parâmetros magnéticos foram mantidos fixos. Mudanças espectrais obtidas com a incorporação dos fármacos devem ser

refletidas, portanto, em diferenças nos coeficientes do potencial de orientação e nas taxas de difusão, conduzindo, portanto, a parâmetros de ordem e mobilidades distintos. Finalmente, a fim de evitar mínimos locais, diferentes conjuntos de valores de entrada para os parâmetros dinâmicos e para os coeficientes do potencial de orientação foram reiniciados no processo de simulação.

Com relação às magnitudes das taxas de difusão, é sabido que os valores de $R_{//}$ para marcadores de spin em membranas, em geral, são bem maiores que os de $R_{\perp}$ (108-111) e isto conduz a uma insensibilidade da técnica de RPE em monitorá-lo. Com isso, foi fixado $R_{//} = 10R_{\perp}$ em todo o processo de simulação para todas as amostras. Tentativas de simulação com variação desta razão foram feitas e uma insensibilidade dos espectros simulados aos valores de $R_{//}$ foi observada, nos conduzindo, portanto, a manter esta razão fixa.

Similarmente à forma conduzida na seção de análise dos espectros de RPE pelo método convencional, as simulações espectrais deveriam ser divididas entre aquelas realizadas na fase fluida e na fase gel do modelo de membrana. Antes de iniciarmos a análise da fase gel por simulações espectrais cabe, portanto, mencionar que simulações também foram realizadas para todos os marcadores de spin na temperatura de 35°C, ou seja, na fase fluida do DMPC. Como os espectros dos marcadores nesta fase não apresentaram mudanças na presença dos fármacos em comparação com os espectros do lipídio puro (vide seções anteriores), não foi observada, nas simulações, perturbação alguma no parâmetro de ordem e nas taxas de difusão rotacionais com a incorporação dos mesmos. Este fato é consistente, pois, com a extensa discussão realizada nas seções anteriores. Sendo assim, optamos por não apresentar os resultados específicos obtidos por simulação através do pacote NLSL para a fase fluida e mantermos apenas a discussão dos

resultados obtidos nessa fase utilizando os parâmetros discutidos na seção 2.6.1. Portanto, por propósito de apresentação, apenas mostramos os melhores ajustes dos espectros da fase gel.

3.3.1 Fase Gel

Na fase gel, realizamos a simulação dos espectros dos marcadores n-PCSL em membranas de fosfolipídio DMPC puro e na presença dos fármacos CQ e PQ. A temperatura de 20°C foi escolhida para esta discussão inicial já que os espectros aí obtidos caracterizam bem o processo de interação dos fármacos com a membrana modelo.

No processo de simulação dos espectros obtidos na temperatura de 20°C, altas correlações entre os coeficientes c_{20} e c_{22} do potencial de orientação foram encontradas. Esta interdependência foi resolvida anulando-se o coeficiente c_{22} . A introdução do coeficiente c_{40} nas simulações levou a melhoras significativas do espectro teórico gerado se comparado ao espectro experimental. Este fato somado às baixas correlações entre este coeficiente e o coeficiente c_{20} nos levaram a adotá-lo em todo o processo de simulação na temperatura de 20°C, exceto com os marcadores mais próximos ao centro da bicamada, ou seja, 14- e 16-PCSL. Os melhores ajustes dos espectros dos marcadores na fase gel da bicamada são apresentados em vermelho nas Figuras 24, 25 e 26, abaixo do espectro experimental.

Figura 24. Espectros de RPE dos marcadores de spin 5- e 7-PCSL na fase gel (20 °C) inseridos em DMPC, sem e com a adição dos fármacos. As curvas em vermelho abaixo dos espectros experimentais representam os melhores ajustes obtidos a partir das simulações. A largura total dos espectros é de 100 G.

A Tabela 2 sumariza os melhores parâmetros espectrais obtidos do processo de simulação. Os valores dos parâmetros magnéticos não se modificaram de maneira significativa com relação aos tabelados no artigo utilizado como referência. Cabe mencionar, no entanto, que os melhores ajustes teóricos forneceram valores menores de g_{xx} dos marcadores 14- e 16-PCSL se comparados com os outros marcadores n-PCSL ($n = 5, 7, 10$ e 12). Entretanto tal variação com relação aos parâmetros obtidos no artigo de referência não passou de 0,05% e, portanto, foram utilizados em todo o processo de simulação.

Tabela 2. Parâmetros magnéticos e dinâmicos obtidos por simulação com o pacote NLSL dos espectros dos marcadores n-PCSL em amostras de DMPC puro e com a incorporação dos fármacos antimaláricos medidos à 20 °C.

Amostra (DMPC)	Componente	g_{xx}	g_{yy}	g_{zz}	A_{xx}	A_{yy}	A_{zz}	$R_{\perp}$ ($\times 10^8 \text{ s}^{-1}$)	S_0
5-PCSL	1							0,35	0,58
CQ	1	2,0087	2,0060	2,0021	4,9	4,9	34,8	0,36	0,58
PQ	1							0,57	0,50
7-PCSL	1							0,41	0,53
CQ	1	2,0087	2,0059	2,0021	5,1	4,9	34,5	0,54	0,48
PQ	1							0,64	0,44
10-PCSL	1							0,54	0,42
CQ	1	2,0087	2,0059	2,0021	4,9	4,9	34,4	0,54	0,42
PQ	1							0,73	0,32
12-PCSL	1							0,59	0,36
CQ	1	2,0088	2,0059	2,0021	4,9	4,9	34,3	0,60	0,35
PQ	1							0,82	0,20
14-PCSL	1 (51%)							0,67	0,27
	2 (49%)							0,36	0,36
CQ	1 (59%)	2,0084	2,0060	2,0021	4,9	4,9	33,8	0,69	0,26
	2 (41%)							0,34	0,36
PQ	1							1,01	0,12
16-PCSL	1							0,76	0,22
CQ	1	2,0083	2,0060	2,0021	4,9	4,9	33,6	0,77	0,22
PQ	1							1,99	0,11

Observação: O erro no valor de $R_{\perp}$ foi estimado em 5% e no valor de S_0 , em 2%. Estes erros são maiores que os desvios obtidos entre os valores referentes ao valor médio (apresentado na tabela) das tentativas de simulação. Os valores das componentes do tensor A estão dados em Gauss.

Como pode ser observado nas Figuras 24, 25 e 26, com exceção dos espectros do marcador 14-PCSL (Figura 26), todos os outros espectros apresentaram apenas uma componente. Uma aplicação particularmente útil do programa NLSL é a resolução de espectros multicomponente, para os quais é possível a determinação das populações relativas e dos parâmetros dinâmicos e estruturais de ambas as componentes. As duas componentes observadas nos espectros do marcador de spin 14-PCSL inserido em DMPC puro são oriundas de radicais nitróxido em ambientes lipídicos diferentes. Como pode ser observado na Figura 26, a adição de cloroquina em vesículas de DMPC puro não muda a característica de duas componentes do espectro. Os parâmetros dinâmicos e estruturais obtidos da simulação dos espectros do 14-PCSL em DMPC puro não se modificam significativamente com a adição da CQ (Tabela 2). Esse

fármaco produz apenas uma variação na relação entre as populações das duas componentes. A população da componente mais fluida do espectro é alterada de 51% em DMPC puro para 59% com a adição da CQ. Esta observação será discutida com maiores detalhes na próxima seção.

Figura 25. Espectros de RPE dos marcadores de spin 10- e 12-PCSL na fase gel (20 °C) inseridos em DMPC, sem e com a adição dos fármacos. As linhas em vermelho abaixo dos espectros experimentais representam os melhores ajustes obtidos a partir das simulações. A largura total dos espectros é de 100 G.

Figura 26. Espectros de RPE dos marcadores de spin 14- e 16-PCSL na fase gel (20 °C) inseridos em DMPC, sem e com a adição dos fármacos. As linhas em vermelho abaixo dos espectros experimentais representam os melhores ajustes obtidos a partir das simulações. As curvas apresentadas em azul são espectros das duas componentes encontradas com o marcador 14-PCSL. As populações de cada componente também são mostradas. A largura total dos espectros é de 100 G.

A adição de primaquina, contudo, modifica a característica de duas componentes do espectro. Comparativamente à componente mais fluida do lipídio puro, foi encontrada uma redução significativa do parâmetro de ordem (0,27 para 0,12) das cadeias acila na região monitorada pelo 14-PCSL e um aumento considerável na taxa de difusão rotacional ($0,67 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ para o DMPC puro e $1,01 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ em vesículas de DMPC/PQ), evidenciando a forte perturbação deste fármaco na bicamada lipídica.

O comportamento dos dados apresentados na Tabela 2 em função da posição na bicamada e as variações ocorridas na presença dos fármacos são mais facilmente visualizados na Figura 27 que mostra a variação do parâmetro de ordem e da mobilidade das cadeias lipídicas, representada pelo $\log R_{\perp}$, ao longo de toda a região hidrofóbica da bicamada quando os fármacos são incorporados. Primeiramente, podem ser observadas, para todas as amostras, uma diminuição do parâmetro de ordem e um aumento da mobilidade dos marcadores de spin ao percorrer a cadeia lipídica em direção ao centro da bicamada. As simulações dos espectros obtidos na temperatura de 20°C mostram que a incorporação da cloroquina provoca alteração observável no espectro de RPE apenas na região do carbono sete das cadeias acila. O efeito deste fármaco, como verificado nas seções anteriores, é de reduzir o empacotamento da membrana naquela região, evidenciado pela redução do parâmetro de ordem (Figura 27). Isto leva, consequentemente, a um aumento da mobilidade rotacional dos marcadores, conforme verificado pelo aumento nos valores de $R_{\perp}$ apresentados na Tabela 2 e na inserção do gráfico da Figura 27. A magnitude deste efeito pôde, contudo, ser quantificada separadamente com a utilização das simulações dos espectros. Por outro lado, o efeito da primaquina sobre a dinâmica e ordenamento das cadeias lipídicas se estende ao longo de todo o interior hidrofóbico da bicamada. Pode ser notada grande variação da mobilidade dos marcadores e redução marcante no parâmetro de ordem dos lipídios.

No intuito de quantificar mais apropriadamente a fase gel das membranas na qual foram detectadas as mudanças mais significativas quando da presença dos fármacos dentro do intervalo de 5 à 23°C, e os efeitos causados por eles na região próxima ao centro da bicamada, os espectros dos marcadores 14- e 16-PCSL foram simulados em todo o intervalo de temperatura em que as medidas foram realizadas. As duas próximas seções detalham os resultados.

Figura 27. Variação do parâmetro de ordem e da mobilidade (inserção) das cadeias lipídicas na ausência e na presença dos fármacos antimaláricos monitorados pelos marcadores de spin n-PCSL ($n = 5, 7, 10, 12, 14$ e 16). A dinâmica rotacional foi apresentada como o logaritmo natural de R_1 . A incerteza no valor de R_1 foi estimada em 5% e no valor de S_0 , em 2%.

3.3.2 14-PCSL

Os espectros obtidos com o marcador de spin 14-PCSL em todo o intervalo de temperatura e para todas as amostras foram simulados e os melhores ajustes de alguns deles são apresentados na Figura 28. Algumas dificuldades foram encontradas na simulação dos espectros em baixa temperatura. Várias tentativas com todos os coeficientes do potencial de orientação foram feitas. Os coeficientes c_{42} e c_{44} não modificavam o valor de S_0 numa extensão significativa. Além disso, as mudanças espectrais produzidas pela introdução destes parâmetros eram tão sutis, que por vezes não eram observadas. Portanto, eles foram tomados como nulos em todo o processo de simulação. Concentramos esforços com os parâmetros c_{20} , c_{22} e c_{40} . Várias tentativas foram realizadas com esses coeficientes e para os espectros obtidos em baixa temperatura, a correlação entre os coeficientes c_{20} e c_{22} mostrou-se muito alta em todas as tentativas. Portanto, anulando c_{22} , estes espectros foram simulados apenas com os coeficientes c_{20} e c_{40} . Esses parâmetros foram utilizados em todas as simulações na fase gel, inclusive dos espectros dos marcadores 5-, 7-, 10- e 12-PCSL na temperatura de 20°C apresentados na seção anterior. Na expansão do potencial de orientação (seção 2.6.2), estes termos multiplicam os harmônicos esféricos que possuem simetria cilíndrica em torno do eixo diretor da membrana. O fato do coeficiente c_{40} ter-se mostrado importante nas simulações dos espectros dos marcadores supracitados na fase gel da membrana, pode estar relacionado com o maior ordenamento das cadeias lipídicas nesta fase. Com isso, o desvio da simetria cilíndrica, que usualmente é determinado através do parâmetro S_2 (seção 2.6.2) parece não ser um termo importante, levando a altas correlações entre os coeficientes c_{20} e c_{22} . O coeficiente c_{22} foi utilizado apenas na fase

fluida da membrana e para o marcador 16-PCSL, que possui uma mobilidade muito maior que os demais.

Figura 28. Variação com a temperatura dos espectros de RPE do marcador de spin 14-PCSL inseridos em DMPC puro (coluna à esquerda) e na presença da primaquina (coluna central) e cloroquina (coluna à direita). Os espectros experimentais estão apresentados na cor preta e os melhores ajustes teóricos, na cor vermelha. Os números ao lado de cada espectro referem-se à temperatura na qual eles foram medidos. Largura total dos espectros: 100 G.

As simulações dos espectros do marcador 14-PCSL na fase fluida foram realizadas utilizando o mesmo conjunto de parâmetros especificados na fase gel (c_{20} e c_{40}). Entretanto, o valor de c_{40} era insensível a grandes mudanças no espectro. Anulando este parâmetro, novas tentativas de simulação foram feitas com a introdução do coeficiente c_{22} . Em princípio houve uma grande melhora nas simulações, contudo uma correlação razoável entre este parâmetro e o c_{20} foi encontrada. Com isso, tomamos c_{22} nulo e prosseguimos apenas com um único coeficiente do potencial de orientação.

Qualitativamente, a existência de uma segunda componente observada em algumas temperaturas da fase gel *ripple* (entre 15 e 21°C da Figura 28) do DMPC puro (coluna à esquerda nesta mesma figura) e com a cloroquina incorporada (coluna à direita), mostra que esse fármaco não é capaz de modificar a característica de duas componentes do espectro do marcador no intervalo de temperatura supracitado. Os espectros experimentais não apresentam mudanças marcantes com a introdução da CQ, evidenciando a incapacidade dessa molécula em penetrar no centro da bicamada. A adição da primaquina, em contrapartida, parece levar à supressão desta segunda componente em algumas temperaturas, evidenciando a desestabilização da fase gel *ripple* da membrana por esta molécula, fato mencionado nas seções anteriores. Em todos os espectros na fase fluida, não são observadas mudanças significativas nos espectros de RPE com a adição dos fármacos.

Para uma análise mais detalhada das duas componentes obtidas em algumas temperaturas, são apresentados na Figura 29 alguns espectros de RPE de duas componentes do marcador 14-PCSL inseridos em vesículas de DMPC, na ausência e na presença dos fármacos. Pode ser observada a supressão, pela primaquina, da segunda componente dos marcadores em DMPC puro na temperatura de 17,2°C (claramente de uma única componente), evidenciando, novamente, o efeito de diminuição do ordenamento molecular e aumento da mobilidade das cadeias lipídicas

induzidas por este fármaco. Com exceção do espectro obtido na temperatura de 14,9°C, em todo o intervalo de temperatura utilizado, os espectros com a primaquina incorporada apresentavam uma única componente.

Por outro lado, presença de cloroquina e no intervalo de 15°C até a temperatura de transição de fase do DMPC (fase gel *ripple*), a característica de duas componentes do espectro do marcador 14-PCSL não se altera. Os parâmetros dinâmicos e estruturais obtidos das simulações destes espectros são muito similares no caso do lipídio puro e deste com a CQ incorporada. A única diferença marcante oriunda das simulações espectrais refere-se à diferença populacional das duas componentes. Pode ser observado na Figura 29 que a população da componente fluida dos espectros teóricos obtidos é aumentada em 10% com a incorporação da cloroquina.

Antes de tecermos alguma observação sobre as populações das componentes nos espectros das amostras contendo CQ, façamos uma análise específica das populações das componentes presentes nos espectros do marcador 14-PCSL em DMPC puro. Neste caso, pode ser notado um aumento com a temperatura da população da componente que reflete as micro-regiões mais empacotadas e consequente diminuição da população da componente fluida (Figura 29). Em temperaturas acima de 23°C, os espectros de RPE são característicos de uma única componente. Se extrapolarmos esta variação das populações até a temperatura de transição de fase, podemos supor que haverá uma predominância da componente rígida na transição principal, ou seja, que o número médio de moléculas de fosfolipídios marcadas com o 14-PCSL sentindo essa região mais empacotada deve possuir uma contribuição maior no evento térmico referido.

Figura 29. Espectros de RPE em três temperaturas distintas do marcador de spin 14-PCSL em DMPC na ausência (coluna à esquerda) e na presença da cloroquina (coluna à central) e da primaquina (coluna à direita). Os melhores ajustes são apresentados na cor vermelha e os espectros teóricos gerados para as duas componentes são mostrados na cor azul com as respectivas populações. Os espectros obtidos com a adição da PQ nas temperaturas de 17,2 e 18,8 °C foram ajustados com uma única componente. Largura total dos espectros: 100 G.

A interação da cloroquina, como os dados sugerem, parece ser mais proeminente na região próxima à cabeça polar dos lipídios. Possivelmente uma penetração de parte desta

molécula acontece em torno desta região. A molécula de CQ pode atuar criando espaços na membrana que afetam apenas o marcador 7-PCSL (em temperaturas próximas à transição principal), com a diminuição do seu parâmetro de ordem e aumento da sua mobilidade (Tabela 2). Esse efeito não se reflete em mudanças nos parâmetros estruturais e dinâmicos do marcador 14-PCSL, assim como também não afetam os marcadores 10-, 12- e 16-PCSL em 20°C (valores de S_0 e $R_{\perp}$ apresentados na Tabela 2), mas aparece na diferença das populações das componentes rígida e fluida.

Das simulações com o programa NLSL, foi encontrada uma diminuição da ordem de 10% da população da componente rígida com a incorporação da CQ às membranas (Figura 29). Dos experimentos de DSC, o aumento na largura da curva de transição principal do DMPC com a presença da cloroquina é um indicativo de redução da unidade cooperativa, que é um parâmetro cujo valor é dado em número de moléculas (definição na seção 2.5.1). Ou seja, a adição da CQ às membranas parece proporcionar uma redução do número médio de moléculas que cooperam mutuamente para a realização deste evento térmico. Esta variação pode estar relacionada com a redução da população do micro-ambiente mais rígido sentido pelo 14-PCSL.

Além disso, no espectro obtido em 14,9°C na presença da **primaquina** há uma predominância da população da componente mais fluida (82% contra 18% da população da componente rígida). Isto é um indicativo de que, ainda nesta temperatura, há uma reduzida população em micro-regiões com maior empacotamento, apesar do grande efeito de diminuição do ordenamento molecular causado pela presença da PQ. Acima desta temperatura, apenas as micro-regiões mais fluidas são experimentadas pelo marcador, possivelmente pela inexistência das regiões com maior empacotamento após adição de PQ.

Na Figura 30 são apresentadas as variações com a temperatura do parâmetro de ordem de cada componente espectral e da taxa de difusão rotacional (representada pelo $\log R_{\perp}$ na inserção da mesma figura), na ausência e na presença dos fármacos. Pode ser observado que a primaquina e a cloroquina não são capazes de modificar a dinâmica e o ordenamento das cadeias lipídicas em temperaturas abaixo de 10 °C e na fase fluida da membrana. Nesta figura é evidenciado o aumento de fluidez das vesículas lipídicas proporcionado pela primaquina, com deslocamento da temperatura de transição. Como mencionado anteriormente e evidenciado pelo gráfico, os parâmetros estruturais e dinâmicos das duas componentes observadas com o DMPC puro e com a cloroquina inserida são similares. O mesmo pode ser dito com relação à componente rígida observada no espectro à 14,9 °C obtido com a incorporação da PQ.

Como não sabemos se há uma supressão da componente fluida na transição ou se ambas as componentes participam deste evento térmico (esta última hipótese é a que acreditamos que seja a correta), os valores de S_0 e do $\log R_{\perp}$ das duas componentes foram traçadas com linhas contínuas na transição para a fase líquido-cristalina do DMPC. Em contrapartida, as diferenças significativas dos parâmetros que caracterizam o sistema abaixo de 10 °C com aqueles da componente mais rígida nos levaram a supor que deva haver uma supressão desta componente ou a população da mesma é tão baixa que não é detectada nos experimentos de RPE.

Figura 30. Dependência com a temperatura do parâmetro de ordem dos marcadores de spin 14-PCSL inseridos em vesículas de DMPC na ausência e na presença dos fármacos antimaláricos. A inserção nesta figura mostra a variação do logaritmo natural de $R_{\perp}$ com a temperatura. Os parâmetros da segunda componente dos espectros também são apresentados. A incerteza no valor de $R_{\perp}$ foi estimada em 5% e no valor de S_0 , em 2%.

3.3.3 16-PCSL

Os espectros obtidos com o marcador de spin 16-PCSL em todo intervalo de temperatura e para todas as amostras também foram simulados e os melhores ajustes de alguns deles são apresentados na Figura 31. Assim como no caso dos ajustes dos espectros do 14-PCSL, encontramos algumas dificuldades na simulação dos espectros referentes ao marcador 16-PCSL em baixa temperatura. Várias tentativas com todos os coeficientes do potencial de orientação

foram feitas. Contudo, neste caso de baixas temperaturas, somente o coeficiente c_{20} foi utilizado para os ajustes. Nas simulações dos espectros na fase fluida, a introdução do coeficiente c_{22} levou a melhoras razoáveis nos espectros calculados e baixa correlação entre este coeficiente e o c_{20} foi obtida. A introdução dos outros coeficientes do potencial de orientação não produziu ajustes melhores dos espectros simulados aos dados experimentais e não modificou o parâmetro de ordem S_0 , além de produzir altas correlações com os coeficientes c_{20} e c_{22} .

Na fase fluida, os baixos valores encontrados para o parâmetro de ordem S_0 (0,09 em 25°C e 0,01 em 50°C) indicam que as cadeias lipídicas estão em um ambiente mais desorganizado e com uma dinâmica maior, esta última refletida nos altos valores do parâmetro $R_{\perp}$ ($2,5 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ em 25° e $5,8 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ em 50°C). Por conseguinte, as cadeias lipídicas experimentam várias orientações dentro do cone definido pelo ângulo associado ao valor de S_0 (definição na seção 2.6.2) em tempos muito curtos, o que poderia, em princípio, levar à promediação da anisotropia espacial e alta correlação, portanto, entre os coeficientes c_{20} e c_{22} . Contudo, este não parece ser o caso, devido à importância da introdução do coeficiente c_{22} nas simulações e a baixa correlação encontrada entre este e o coeficiente c_{20} .

Figura 31. Variação com a temperatura dos espectros de RPE do marcador de spin 16-PCSL inseridos em DMPC puro (coluna à esquerda) e na presença da primaquina (coluna central) e cloroquina (coluna à direita). Os espectros experimentais estão apresentados na cor preta e os melhores ajustes teóricos, na cor vermelha. Os números ao lado de cada espectro referem-se à temperatura na qual eles foram medidos. Largura total dos espectros: 100 G.

Antes de fazermos uma análise da variação do parâmetro de ordem e da taxa de difusão rotacional destes marcadores e as mudanças destes parâmetros induzidas pelos fármacos, devemos atentar para a possível existência de uma segunda componente nos espectros do 16-PCSL com a primaquina incorporada à membrana de DMPC nas temperaturas de 5,9, 10,1 e 15,2°C. A Figura 32 mostra os espectros deste marcador nas três temperaturas mais baixas estudadas e as tentativas de simulação com uma e duas componentes destes espectros. O espectro na temperatura de 15,2 °C mostra claramente uma segunda componente espectral evidenciada pelo decaimento da forma de linha do espectro em campo baixo (seta na Figura 32). À temperatura de 10°C, o espectro é similar àquele de duas componentes obtido para o marcador 14-PCSL em DMPC puro na temperatura de 18,6 °C (Figura 29). Por fim, à 5,9 °C, a forma de linha do espectro em campo baixo não é tipicamente encontrada em espectros de uma única componente deste marcador de spin como se vê da simulação com uma única componente para este caso (Figura 32). Pode ser observado que as simulações com duas componentes desses espectros são as que melhor ajustam as curvas experimentais. Com as justificativas acima, temos indícios, portanto, da existência de uma segunda componente espectral, surgida de um micro-ambiente distinto experimentado pelo marcador 16-PCSL na presença de primaquina.

Por outro lado, não há evidências concretas da existência desta segunda componente nos espectros de RPE do lipídio puro e com a cloroquina incorporada. Os espectros do 16-PCSL inseridos no DMPC puro nas temperaturas de 6,6 e 10,2 °C e na presença da CQ nas temperaturas de 6,3 e 10,0 °C também foram simulados tanto com uma quanto com duas componentes. Os melhores ajustes obtidos podem ser visualizados na Figura 33. Pode ser observado que as simulações com duas componentes apresentaram bons ajustes na linha de campo baixo, enquanto que o ajuste com uma única componente foi superior na linha de campo alto. Contudo, como as simulações não se mostraram satisfatórias em nenhum dos dois casos e em sendo as curvas

teóricas obtidas muito similares em sua forma, **não** há justificativa conclusiva que conduza à sustentação da existência de uma segunda componente nestes espectros, como visto nos espectros do marcador 16-PCSL com a primaquina incorporada.

Figura 32. Espectros de RPE do marcador de spin 16-PCSL em DMPC na presença da primaquina. A coluna à esquerda mostra os melhores ajustes (na cor vermelha) dos espectros experimentais com uma componente. A coluna à direita apresenta os melhores ajustes com duas componentes. Os espectros teóricos das duas componentes são mostrados na cor azul com as respectivas populações. Largura total dos espectros: 100 G.

Estas informações levam a um importante efeito induzido pela PQ e que não pôde ser determinado através das análises baseadas nos parâmetros empíricos. Em baixas temperaturas, os marcadores de spin 16-PCSL incorporados em vesículas de DMPC sentem um ambiente mais rígido na presença do fármaco. Isto é refletido nos espectros de RPE como uma segunda componente, com uma mobilidade mais restrita. Esta é uma evidência direta da penetração desta molécula até o centro da bicamada.

Com a discussão dos espectros em baixa temperatura realizada, passamos à análise dos efeitos causados pelos fármacos na dinâmica e estrutura lipídicas em todo o intervalo de temperatura, com o objetivo de monitorar a transição de fase do DMPC. Na Figura 34 são apresentados a variação com a temperatura do parâmetro de ordem e da mobilidade (representada pelo $\log R_{\perp}$ na inserção desta figura) dos marcadores de spin 16-PCSL, na ausência e na presença dos fármacos. Qualitativamente, em todo o intervalo de temperatura estudado, as simulações computacionais forneceram os mesmos resultados obtidos com o método convencional de análise, ou seja, nenhuma perturbação provocada pela CQ à bicamada em ambas as fases lipídicas e deslocamento da temperatura de transição de fase principal induzido pela PQ. Além disso, parece não haver qualquer efeito dos fármacos sobre as regiões lipídicas monitoradas pelo 16-PCSL na fase fluida da membrana. Diferentemente do método convencional, as taxas de difusão rotacional puderam ser determinadas em **todo** o intervalo de temperatura estudado, bem como a magnitude do parâmetro de ordem do sistema.

Pode ser notado claramente nos gráficos que a segunda componente obtida das simulações dos espectros com a incorporação da PQ reflete um ambiente mais rígido (maiores valores de S_0 na Figura 34) com uma dinâmica reduzida (menores valores de $R_{\perp}$ na inserção da mesma figura).

Figura 33. Espectros de RPE do marcador de spin 16-PCSL em DMPC na ausência (coluna à esquerda) e na presença da CQ (coluna à direita). Os melhores ajustes são apresentados na cor vermelha e os espectros teóricos gerados para as duas componentes são mostrados na cor azul com as respectivas populações. Para cada temperatura, primeiramente é mostrado o ajuste com uma componente e em seguida, o ajuste com duas. Largura total dos espectros: 100 G.

Figura 34. Dependência com a temperatura do parâmetro de ordem das cadeias lipídicas monitoradas pelos marcadores de spin 16-PCSL inseridos em vesículas de DMPC na ausência e na presença dos fármacos antimaláricos. A inserção nesta figura mostra a variação do logaritmo natural de $R_{\perp}$ com a temperatura. Os parâmetros da segunda componente dos espectros com a incorporação da PQ também são apresentados. A incerteza no valor de $R_{\perp}$ foi estimada em 5% e no valor de S_0 , em 2%.

A região onde o fármaco está inserido no centro da bicamada deve ser estabilizada por interações hidrofóbicas entre ele e as cadeias lipídicas. Os marcadores inseridos nesta região sentem consequentemente, um ambiente mais empacotado. Isto é refletido no parâmetro de ordem das cadeias lipídicas destes marcadores e na mobilidade rotacional dos radicais nitróxidos. Analisando as populações relativas das duas componentes (Figura 32) nota-se que, na temperatura de 15,2°C, mesmo quando a taxa de difusão da componente mais fluida ($R_{\perp} = 0,83 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$) se aproxima daquela obtida na simulação do espectro de uma componente na temperatura de 17,1°C ($R_{\perp} = 1,06 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$), ainda há regiões no centro da bicamada com mobilidade restrita

($R_{\perp} = 0,41 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ em $15,2^{\circ}\text{C}$). Isto é uma evidência que, ainda nesta temperatura ($15,2^{\circ}\text{C}$), há regiões no centro da bicamada nas quais a primaquina está inserida, pois algo em torno de 37% da população total dos marcadores de spin (Figura 32) ainda possui movimento rotacional limitado.

3.4 Discussão dos Resultados

Nesta seção sumarizamos os resultados obtidos através dos experimentos de RPE e DSC das interações entre as moléculas primaquina e cloroquina com modelos de membrana constituídas pelo fosfolipídio DMPC, relacionando-os com dados da literatura.

Foi demonstrado conclusivamente que a magnitude dos efeitos provocados pela interação da primaquina com as vesículas lipídicas de DMPC é maior que os efeitos causados com a adição de cloroquina. Ambos os experimentos suportam a visão que a CQ produz somente efeito moderado na estrutura e dinâmica das cadeias lipídicas, enquanto que o empacotamento da fase gel *ripple* da membrana é fortemente afetado quando a PQ é incorporada. Os efeitos da primaquina se estendem ao longo de toda a região lipídica, enquanto que a cloroquina parece perturbar apenas a região próxima ao carbono sete da cadeia acila.

O conhecimento da natureza de uma molécula interagente e da membrana de interesse desempenha um papel crucial no entendimento das interações entre estas moléculas e modelos de biomembranas. Neste sentido, a análise das estruturas dos fármacos antimaláricos pode ser útil para o entendimento dos resultados experimentais obtidos.

Conforme mencionado na seção introdução, em pH fisiológico há uma predominância da forma monoprotonada da primaquina e uma mistura das formas mono- e diprotonada da cloroquina. Perussi *et. al.* (112) demonstraram que estes valores podem ser modificados na presença de micelas carregadas e zwitteriônicas. Como as mudanças nos valores dos pK 's devem possuir maior contribuição das interações eletrostáticas entre a cabeça polar dos lipídios e os nitrogênios carregados dos fármacos, em princípio, o comportamento das variações dos valores dos pK 's dos fármacos, obtidos em interações com micelas, podem ser utilizados como referência para o caso de interações com lipídios. Foi mostrado, naquele artigo, que as variações do pK_1 da cloroquina e do pK_2 da primaquina na presença de micelas compostas com um surfactante zwitteriônico foram bem pequenas (redução dos valores em torno de 0,1 e 0,2 unidades). Como a carga superficial de vesículas lipídicas é diferente comparativamente à de micelas, deve haver alteração na incorporação dos fármacos e consequente modificação dos valores dos pK 's. Contudo, se o **comportamento** das variações dos valores dos pK 's for similar, ou seja, puder ser extrapolada, as formas predominantes destas moléculas em pH 7,5 (utilizado nesta dissertação) não devem ser muito modificadas na presença de lipídios de DMPC. Esta extrapolação do comportamento foi realizada devido a falta de informações na literatura concernentes à interação destes fármacos com vesículas lipídicas e as alterações dos valores dos pK 's dos grupos protonáveis.

Usando a técnica de RPE, foi demonstrado nesta dissertação que a região em torno do carbono sete da cadeia acila dos lipídios DMPC em bicamadas é levemente perturbada pela incorporação da cloroquina. Em temperaturas próximas (por valores menores) à temperatura de transição de fase principal do DMPC, a incorporação da CQ na membrana reduz o ordenamento e aumenta a mobilidade das cadeias nesta região. Estes efeitos não foram observados em outras regiões ao longo da cadeia lipídica. Este resultado pode ser um indício de penetração parcial

desta molécula, que deve se estender até a região monitorada pelo marcador 7-PCSL. Esta pequena, mas observável perturbação na membrana é corroborada pelos estudos por calorimetria. A diminuição da cooperatividade da transição principal é um forte indício de ou penetração de parte da estrutura da molécula ou uma pequena quantidade da mesma se insere nas membranas. Os estudos de RPE, contudo, sugerem que a primeira hipótese se mostra mais satisfatória. A segunda asserção deve ser descartada pelo fato de não ter sido observada qualquer alteração, mesmo usando simulações espectrais, do parâmetro de ordem e da taxa de difusão rotacional dos marcadores no interior hidrofóbico.

Os resultados deste trabalho sugerem, portanto, que as formas mono e diprotonada da cloroquina devem interagir eletrostaticamente com o grupamento fosfato das cabeças polares do fosfolípido zwitteriônico do DMPC, levando este fármaco a localizar-se mais preponderantemente nestas regiões. Há dados na literatura que corroboram tal asserção (113). Cabe mencionar, contudo, que os resultados obtidos nesta dissertação não sustentam esta hipótese na fase fluida da membrana. Pode ser especulado que o grupo polar da CQ deve ancorar perto da cabeça polar dos lipídios e os metilenos da cadeia do fármaco devem intercalar entre as cadeias acila sem grande extensão na penetração. Esta suposição pode ser fundamentada se levarmos em consideração o nitrogênio carregado da amina terciária (Figura 1) da cloroquina. Este grupamento também pode interagir eletrostaticamente com o grupo fosfato das cabeças polares. Com isso, apenas uma pequena fração deste fármaco estaria inserida na bicamada. Esta pequena extensão na penetração não seria capaz de mudar a dinâmica e ordenamento lipídicos na região próxima à cabeça polar, monitorada pelo marcador 5-PCSL, mas poderia aumentar a fluidez da fase gel *ripple* na região monitorada pelo marcador 7-PCSL apenas em temperaturas próximas à transição principal. Esta hipótese de inserção de pequena fração da CQ nas membranas poderia explicar a redução da cooperatividade da transição principal e os efeitos desprezíveis observados em regiões

próximas ao centro da bicamada. Novos estudos devem, contudo, ser realizados no intuito de corroborar ou contestar esta hipótese.

Como sugere nosso trabalho, a limitada capacidade de penetração nas membranas apresentada pela cloroquina é evidenciada pela sua fraca interação com o interior hidrofóbico de bicamadas lipídicas. É bem conhecido que este fármaco não interage fortemente com as cadeias acila das componentes zwitteriônicas fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina de membranas (114-117). Usando a técnica de ressonância magnética nuclear, Zidovetzki *et. al.* (118) mostraram que a cloroquina apresenta apenas uma pequena perturbação em modelos de membranas de eritrócitos humanos. O autor encontrou uma leve redução do parâmetro de ordem apenas das cadeias acila da fosfatidilserina das membranas lipídicas; todavia não foi detectada qualquer alteração deste parâmetro para a fosfatidilcolina. Em vista disso, a cloroquina não possui grande capacidade de penetração nas bicamadas lipídicas e, deve estar localizada, por conseguinte, principalmente na região polar dos fosfolipídios. Os resultados obtidos nesta dissertação são consistentes, portanto, com os reportados na literatura.

As bases moleculares da ação da cloroquina ainda não são completamente entendidas, mas é corrente que um possível mecanismo de ação esteja relacionado com a interferência desta molécula com a digestão da hemoglobina. É bem conhecido que a ação antimalárica da CQ depende fortemente da produção de ferriprotoporfirina IX (FP IX) dentro dos vacúolos alimentares das células do hospedeiro (119-122). A FP IX é um produto da digestão da hemoglobina pelos parasitos da malária. Esta proteína livre é tóxica ao parasito (123), portanto, num processo de auto-proteção, a FP IX é polimerizada em hemozoína (HZ) (124) ou degradada pela glutathione (GSH) (125). Dentro do vacúolo alimentar, a CQ se liga com alta afinidade à FP IX (126, 127) evitando a polimerização desta proteína em HZ. Além disso, acredita-se que forma complexada com a CQ também é tóxica ao parasito. Investigando o efeito do complexo FP IX -

CQ em membranas lipídicas, Sugioka *et. al.* (128) especulam que um possível mecanismo de ação antimalárica da cloroquina é devido à clivagem peroxidativa das membranas dos vacúolos dos parasitos da malária.

A possível localização deste fármaco próximo à região polar dos lipídios pode ser importante para o seu mecanismo de ação. Há indícios de que o ferro da FP IX esteja localizado mais próximo da superfície da membrana (129). Este metal é essencial para que o complexo FP IX - CQ induza a peroxidação lipídica. Famin *et. al.* (130) argumentam que isso poderia aumentar a probabilidade de reação da cloroquina com a proteína FP IX, inibindo, pois, a sua degradação pela ação da GSH.

Com relação à primaquina, os resultados obtidos através da técnica de DSC mostram que este fármaco desestabiliza a fase gel *ripple* das membranas, reduz a cooperatividade da transição de fase e é capaz de abolir a pré-transição, mostrando que a PQ interage fortemente com modelos de membranas zwitteriônicas. Estes resultados são refletidos no aumento da fluidez da membrana observada pela redução do ordenamento molecular e aumento da dinâmica rotacional das cadeias dos marcadores de spin naquela fase, utilizados nos experimentos de RPE para monitorar toda a região hidrofóbica da bicamada. Usando esta técnica, foi observado um aumento no empacotamento do centro da bicamada lipídica na fase gel *tilted* das vesículas na presença da PQ, sugerindo uma possível penetração desta molécula nesta região. Contudo, cabe aqui mencionar, que nenhum efeito deste fármaco foi percebido na fase fluida da membrana.

A mais alta capacidade de penetração da primaquina comparada à cloroquina em vesículas zwitteriônicas de DMPC e em pH neutro, provavelmente deve ser devida a maior natureza lipofílica daquela molécula comparada a esta. Como há penetração em grande extensão da PQ em bicamadas, como nossos resultados sugerem, acredita-se que os efeitos hidrofóbicos possuam contribuição principal, provavelmente com a forma descarregada deste fármaco

possuindo uma maior capacidade de penetração nas membranas comparada à forma monoprotonada. Devido à falta de informações na literatura a respeito dos valores dos coeficientes de partição e dos pK 's de ambos os fármacos na presença de vesículas lipídicas, acreditamos que a suposição acima seja razoável dentro dos limites dos resultados obtidos.

Apesar da forte interação observada entre a PQ e vesículas de DMPC, tal interação parece ser não-específica. Não há dados na literatura que suportem o contrário. Com efeito, baseado nos padrões de deslocamento químico em medidas de RMN e nos valores das constantes de associação determinados por espectroscopia de absorção, Perussi *et. al.* (112) mostraram que o modo de interação com micelas dos dois fármacos antimaláricos estudados nesta dissertação, de fato, é não específica.

O mecanismo exato da ação da primaquina também é ainda desconhecido. A possível ação antimalárica deste fármaco deve estar relacionada com sua toxicidade em eritrócitos. Apesar de sua importância clínica, a utilidade deste fármaco tem sido limitada devido a sua capacidade de induzir anemia hemolítica, particularmente em pessoas com deficiência hereditária na atividade da enzima eritrocitária glicose-6-desidrogenase (131, 132).

A primaquina causa estresse oxidativo (133,134) dentro dos eritrócitos através da geração de espécies de oxigênio reativos que suprimem as defesas celulares e atacam macromoléculas da célula (135). A hemotoxicidade apresentada pela primaquina, contudo, parece ser mediada por seus metabólitos (136). Em um estudo utilizando metabólitos derivados deste fármaco, Vásquez-Vivar e Augusto (137) sugeriram que o peróxido de hidrogênio pode ser o produto tóxico formado destes metabólitos. Neste mesmo sentido, Cohen e Hochstein (133) propuseram que a toxicidade da primaquina em células vermelhas é, outrossim, devido à formação de peróxido de hidrogênio pela reação deste fármaco com oxiemoglobinas. Entretanto, a natureza deste processo oxidativo ainda não está completamente entendida. Não há informações conclusivas mostrando

se o efeito antimalárico da primaquina é devido à ação direta deste fármaco ou se é devido aos seus metabólitos (138,139). Os alvos moleculares da ação da primaquina, se proteínas e/ou lipídios, são desconhecidos. Estudos de interação primaquina-membranas, portanto, ganham importância para o entendimento dos mecanismos de ação deste fármaco.

Neste mesmo sentido, apesar de possuir uma atividade antimalárica distinta da primaquina, foi demonstrado conclusivamente que a mefloquina, outra 4-aminoquinolina, como a cloroquina, além de interagir com a FP IX, também interage fortemente com alguns tipos de fosfolipídios, sugerindo, pois, que esta molécula pode apresentar um segundo mecanismo de ação envolvendo forte associação com membranas (140). O resultado obtido nesta dissertação pode ser um indicativo de que a associação da primaquina com membranas possa, da mesma forma, representar uma rota alternativa adicional no mecanismo de ação deste fármaco contra os parasitos da malária. Mais estudos devem ser realizados, contudo, com outros componentes lipídicos de modelos de membranas de parasitos, no sentido de elucidar os possíveis mecanismos de interação deste fármaco.

Além disso, no desenvolvimento de carreadores de fármacos, o entendimento de interações entre estes e os lipídios desempenha um papel crucial (35). Formulações de fármacos com lipossomos podem reduzir a toxicidade e prolongar a ação daqueles em seus sítios específicos, aumentando, assim, a sua eficiência terapêutica. Singh e Vingkar (141) relataram um aumento na atividade antimalárica da primaquina quando encapsulada em nanoemulsões lipídicas, mesmo em doses menores que a convencional. Os autores atribuíram este fato a um aumento da disponibilidade do fármaco no sítio de ação quando encapsuladas com nanoemulsões lipídicas comparadas com somente o fármaco em solução. Já Stensrud *et. al.* (142) estudaram a eficiência do encapsulamento da primaquina em resposta a um gradiente de pH. Os autores relataram que a interação deste fármaco com as membranas leva a um maior empacotamento da

bicamada. Utilizando medidas de potencial zeta, foi mostrado naquele artigo que este fármaco não está associado à superfície e sim, com a região hidrofóbica do lipossomo.

Os resultados obtidos nessa dissertação através da utilização conjunta das técnicas de DSC e RPE concernentes às interações envolvidas entre os fármacos antimaláricos primaquina e cloroquina estão, por conseguinte, consistentes com dados reportados na literatura. As mudanças no comportamento termotrópico de vesículas lipídicas de DMPC obtidas pelos estudos de DSC e os detalhes apresentados das modificações do ordenamento e dinâmica de cada região lipídica pelos estudos de RPE podem ser usados para obter um melhor entendimento dos detalhes moleculares do comportamento destes fármacos em suas ações em sistemas biológicos reais.

CAPÍTULO 4

CONCLUSÕES

O objetivo deste trabalho foi examinar a interação de dois fármacos antimaláricos, primaquina e cloroquina, com membranas modelo constituídas de fosfolipídios de DMPC. Para isso, utilizamos as técnicas de ressonância paramagnética eletrônica e calorimetria diferencial de varredura para investigar mudanças locais na dinâmica e ordenamento das cadeias lipídicas provocadas pela incorporação dos fármacos nas bicamadas e os possíveis efeitos destas moléculas no comportamento termotrópico das vesículas lipídicas.

Com os resultados obtidos através dos experimentos de DSC foi possível gerar um perfil termodinâmico dos efeitos causados pelos fármacos nas membranas, contribuindo, pois, para o entendimento dos fatores que afetam o comportamento termotrópico das fases lipídicas do DMPC. O efeito das moléculas sobre a estrutura da bicamada pôde ser monitorado através de análise dos termogramas, que forneceram informações precisas sobre a temperatura de transição de fase lipídica, unidade cooperativa, entalpia de van't Hoff, entre outros.

Estudos calorimétricos da interação da cloroquina com membranas de DMPC mostraram que nenhuma das transições lipídicas é alterada de maneira significativa pela presença desta

molécula. O efeito insignificante sobre as temperaturas da pré-transição e da transição principal indica que a CQ não intercala em bicamadas zwitteriônicas em grande extensão. Foram observadas apenas mudanças na largura da endoterma da transição principal, indicando uma menor cooperatividade entre os fosfolipídios no evento térmico referido. Estas pequenas mudanças são provavelmente devido à inserção dentro da membrana de uma pequena fração da cloroquina.

A primaquina, contudo, provoca efeitos mais proeminentes no comportamento termotrópico do DMPC. Mudanças na largura da transição principal daquele lipídio e grande redução da temperatura de transição de fase foram observadas na presença deste fármaco. Estes efeitos promovem uma desestabilização da fase gel *ripple* das membranas. Este resultado é um forte indicativo de penetração das moléculas de PQ na bicamada, desorganizando a fase gel *ripple* e reduzindo a cooperatividade dos fosfolipídios na transição principal. Ainda foi observada uma abolição da pré-transição do lipídio.

No intuito de obtermos informações adicionais sobre o ordenamento e taxas de difusão rotacionais das cadeias lipídicas em diferentes regiões da bicamada, utilizamos a técnica de RPE com sondas de spin inseridas nas bicamadas lipídicas. Através dos espectros obtidos destes marcadores pudemos gerar um perfil de interação dos fármacos ao longo da cadeia lipídica do DMPC.

Foi mostrado que a cloroquina produz perturbação apenas na região em torno do carbono sete das cadeias acila do DMPC. O efeito desta molécula é de reduzir o empacotamento desta região e aumentar a dinâmica rotacional das cadeias lipídicas apenas em temperaturas próximas (por valores menores) à temperatura de transição de fase principal do DMPC. Não foram observadas mudanças significativas no empacotamento e na mobilidade das cadeias em todas as outras regiões do interior hidrofóbico da bicamada. Nas fases gel *tilted* e fluida da membrana

também não foram observados qualquer indício de alteração na estrutura do modelo de membrana.

Com relação à primaquina, o monitoramento de toda a região hidrofóbica das vesículas lipídicas com marcadores de spin forneceu informações concretas sobre os efeitos deste fármaco nas bicamadas. Foi observado que esta molécula promove um grande aumento na fluidez das membranas de DMPC no intervalo de temperaturas correspondente à fase gel *ripple* deste lipídio. A redução do empacotamento e aumento da mobilidade das cadeias acila do DMPC apontam neste sentido. Além disso, abaixo da temperatura de 10°C, não foi observada qualquer perturbação deste fármaco em todas as regiões do interior hidrofóbico, exceto no centro da bicamada. Espectros de marcadores de spin localizados nesta porção da membrana apresentaram evidências sobre a existência de duas micro-regiões com empacotamento e dinâmica distintas. Esta segunda componente nos espectros de RPE do marcador 16-PCSL não foi observada com o lipídio puro e com a cloroquina incorporada. Foi demonstrado, por conseguinte, que a primaquina possui uma grande capacidade de penetração em membranas de DMPC. Com este fármaco localizado no centro da bicamada, marcadores de spin em regiões onde esta molécula está presente experimentam um ambiente com mobilidade mais restrita.

Para a análise dos espectros de RPE foram utilizadas duas metodologias distintas, uma baseada em parâmetros empíricos definidos sobre o próprio espectro, que designamos por método convencional, e a outra fazendo uso de simulações espectrais. Cabe aqui, portanto, tecer comentários a respeito das vantagens e desvantagens na utilização de ambas as metodologias empregadas.

O método convencional é muito útil em oferecer análises qualitativas do comportamento dos sistemas e alterações induzidas por agentes externos de uma maneira relativamente simples e rápida. Informações quantitativas, como determinação do parâmetro de ordem do sistema, que

reflete a estrutura lipídica em torno do marcador, e o tempo de correlação rotacional, que reflete a dinâmica dos marcadores de spin e, conseqüentemente, do ambiente em torno do mesmo, não são possíveis para **todos** os marcadores utilizando esta metodologia. Há teorias que relacionam a razão das alturas das linhas do espectro de RPE e a largura da linha central com a determinação do tempo de correlação rotacional. Só que tal metodologia é apenas empregada na fase fluida dos lipídios. Além de ser válida, obviamente, para os marcadores onde as alturas das três linhas do espectro podem ser medidas com precisão. Outras teorias relacionam a determinação do parâmetro de ordem efetivo da região monitorada pelo marcador através de medidas diretas das componentes paralela ($A_{//}$) e perpendicular ($A_{\perp}$) do tensor hiperfino no espectro de RPE. Tal metodologia também só é válida para alguns marcadores de spin onde estes parâmetros podem ser determinados.

Exemplos do limite de aplicabilidade desta metodologia podem ser citados nesta dissertação. Como pode ser observado nas Figuras 16 e 18, devido a dificuldade na determinação do desdobramento hiperfino mínimo dos espectros dos marcadores 5- e 7-PCSL, o valor do parâmetro de ordem efetivo das regiões monitoradas por estes marcadores não pôde ser determinado para as temperaturas abaixo de 15°C. Outro exemplo ocorre para o marcador de spin 16-PCSL. No gráfico da razão h_{+1}/h_0 (Figura 20), a determinação da altura da linha de campo baixo (h_{+1}) é incerta nos espectros daquele marcador com a PQ incorporada devido à presença da segunda componente. Nas temperaturas mais baixas daquela figura, por conseguinte, os valores deste parâmetro não são muito bem definidos.

Não obstante, o método convencional de análise dos espectros de RPE permite extrair informações qualitativas valiosas sobre o sistema em estudo e dentro de alguns limites, informações quantitativas também podem ser determinadas.

O tratamento complementar para obter informações quantitativas sobre o sistema é, portanto, lançar mão de simulações espectrais. A teoria envolvendo simulações é, contudo, complexa. No entanto, simulações baseadas na solução da equação estocástica de Liouville através do programa NLSL tem se mostrado bastante eficaz em avaliar mudanças finas nos espectros de RPE, que poderiam não ser observadas e quantificadas através de parâmetros empíricos. Somente há pouco mais de uma década o programa NLSL tem sido empregado na análise de espectros de RPE no regime de movimento lento. Com as simulações espectrais, podemos determinar, quantitativamente, parâmetros que caracterizam a estrutura dinâmica dos modelos de membrana e as respectivas alterações na presença de moléculas interagentes.

O programa NLSL possui uma grande quantidade de variáveis que podem ser utilizadas no processo de simulação. A escolha correta das mesmas deve ser feita com cautela e é um trabalho por vezes penoso. A tendência das cadeias do marcador em se ordenarem em bicamadas lipídicas é modelada por um potencial de orientação. Os coeficientes da expansão desta função potencial em uma base de harmônicos esféricos generalizados são parâmetros utilizados no processo de simulação. Neste trabalho, a escolha dos coeficientes utilizados foi baseada na análise das mudanças espectrais provocadas com a introdução deles, nas mudanças do parâmetro de ordem da região monitorada pelo marcador escolhido e, principalmente, na correlação entre estes coeficientes. As justificativas da escolha dos coeficientes utilizados no processo de simulação para cada marcador foram discutidas ao longo da seção 3.3. Além disso, o programa permite ajustes de espectro multicomponente, fornecendo informações valiosas sobre as populações relativas e suas possíveis mudanças provocadas por ação de agentes externos que não são percebidas por simples inspeção visual ou quantificadas pelo método convencional. Esta aplicação particularmente útil do programa foi utilizada para a determinação dos parâmetros estruturais e dinâmicos das duas componentes observadas em alguns espectros dos marcadores

14- e 16-PCSL. Teve, portanto, uma contribuição essencial no entendimento dos efeitos causados pela PQ no centro da bicamada e na variação das populações dos marcadores de spin 14-PCSL em vesículas incorporadas com cloroquina. Esta última teve um papel fundamental no entendimento da variação das populações dos dois distintos micro-ambientes experimentados por aqueles marcadores com a diminuição da cooperatividade da transição principal do DMPC induzida pela CQ. Até onde sabemos, este é o primeiro trabalho com simulações de espectros de RPE que relaciona mudanças de população de marcadores de spin com variação da cooperatividade da transição de lipídios induzida por agentes externos. Acreditamos que este detalhamento molecular possa levar a uma melhor compreensão dos efeitos induzidos por moléculas interagentes no comportamento cooperativo das cadeias dos fosfolipídios apresentado na transição principal.

As técnicas empregadas conjuntamente neste trabalho desempenham papel importante no entendimento de interações fármaco-membranas, pois uma caracterização completa da interação pode ser realizada. Com a técnica de DSC, o comportamento macroscópico do sistema é estudado e parâmetros termodinâmicos do mesmo podem ser determinados. Já a técnica de RPE fornece informações locais valiosas sobre a dinâmica rotacional e empacotamento de regiões lipídicas específicas. São, portanto, técnicas que se complementam. A quantidade de parâmetros que pode ser conseguida e o detalhamento molecular obtido justificam, portanto, a utilização conjunta de ambas as metodologias de investigação.

Com o vasto conjunto de dados obtidos através das técnicas de RPE e DSC, pudemos especular sobre a possível localização dos fármacos na bicamada de DMPC. Sucintamente, os resultados apontam para uma possível interação das moléculas de cloroquina com a cabeça polar dos lipídios. Aparentemente, penetração de uma fração da estrutura desta molécula na bicamada deve acontecer. A molécula de primaquina, por sua vez, deve estar localizada mais ao centro da

bicamada lipídica, na fase gel *tilted* da vesícula de DMPC. Estas afirmações foram fundamentadas nos resultados obtidos por ambas as técnicas e em análises da natureza de ambos os fármacos no pH estudado. Cabe mencionar, contudo, que estas asserções não são válidas para a fase fluida da membrana, visto que nenhum efeito foi observado nos espectros de RPE com a incorporação dos fármacos no intervalo de temperatura característico desta fase.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam uma baixa permeabilidade da membrana às moléculas de CQ e uma mais alta associação da primaquina com a região hidrofóbica da bicamada comparativamente à CQ. Conclusões definitivas sobre o significado farmacológico da forte associação encontrada da primaquina com membranas são prematuras neste estágio. Contudo, este resultado pode ser usado como indicação para novos estudos com outras composições lipídicas.

O presente estudo foi limitado a membranas lipídicas artificiais. Portanto, os resultados aqui apresentados devem ser tomados como somente uma indicação das reais interações envolvidas e efeitos causados por estes fármacos em um sistema biológico real, já que foram obtidos de sistemas modelo constituídos de um único fosfolípido. Contudo, supomos que os resultados obtidos neste trabalho devam proporcionar uma compreensão útil dos mecanismos complexos envolvidos na interação destas e outras pequenas moléculas com biomembranas, uma vez que possibilitam fazer inferências em nível molecular destes sistemas.

Propostas para trabalhos futuros

Ao final de todo projeto de mestrado, é natural indicar caminhos a serem seguidos para a continuação e finalização completa do projeto desenvolvido. Alguns aspectos interessantes que podem ser investigados são os seguintes:

- 1) Como não há dados quantitativos suficientes na literatura sobre a segunda componente surgida nos espectros do 14-PCSL em DMPC, poderia ser feito um estudo completo caracterizando as duas componentes obtidas com este marcador de spin em membranas de DMPC. Para isso, pode ser realizado um estudo de RPE multifrequência, onde há possibilidade de separação espectral de ambas as componentes tanto pelo fator giromagnético quanto pelo desdobramento hiperfino, dependendo da banda de frequência utilizada. Os espectros de cada componente podem ser então obtidos por subtração espectral e analisados por simulação, separadamente;
- 2) Um resultado particularmente interessante obtido em nosso trabalho refere-se à analogia encontrada entre a variação populacional das duas componentes do espectro do marcador 14-PCSL pela incorporação da cloroquina com a diminuição da cooperatividade da transição principal do DMPC. Simulações dos espectros de RPE com variação fina no intervalo de temperatura onde foi detectada a segunda componente espectral podem ser relacionadas então com determinações calorimétricas precisas da unidade cooperativa da transição;
- 3) Com relação à interação dos fármacos com modelos de membranas, podem ser testadas novas composições lipídicas, usando-se fosfolipídios carregados com o intuito de investigar se as interações entre estas moléculas e as membranas se dão mais próximas às cabeças polares carregadas dos lipídios. Ou seja, investigarmos se a tendência geral de drogas anfifílicas catiônicas é de interagir mais fortemente com os lipídios carregados negativamente que com os lipídios zwitteriônicos. Esta informação é importante do ponto de vista biofísico, visto que as membranas dos eritrócitos humanos normais (143) e infectados

pela malária (143-147) e as membranas dos parasitos (146, 147) possuem fosfolipídios negativos em sua composição. Adicionalmente, podem ser realizados estudos com variação de pH, visto que há gradientes de pH entre os meios separados pelas membranas dos vacúolos digestivo e alimentar dos parasitos;

- 4) Como a cloroquina se liga fortemente à ferriprotoporfirina IX e este complexo possui uma alta afinidade por membranas, pode ser proposto o estudo da interação deste complexo com modelos de membrana dos parasitos e com os constituintes lipídicos separadamente no intuito de elucidar os mecanismos de interação deste composto. Além disso, podem ser realizadas medidas de RPE através de uma metodologia denominada marcação de spin sítio-dirigida, que vem sendo utilizada com muito sucesso no estudo da conformação de proteínas durante sua ligação com membranas ou com ligantes diversos. Através desta metodologia, as mudanças conformacionais da FP IX podem ser monitoradas quando de sua interação com a cloroquina e com outras 4-aminoquinolinas, como a mefloquina e até mesmo com os lipídios da membrana, uma vez que esta proteína possui grande afinidade a lipídios. O detalhamento molecular destas interações pode ser relevante do ponto de vista farmacológico, uma vez que pode contribuir no entendimento dos motivos pelos quais 8-aminoquinolinas, como a primaquina, por exemplo, não interagem fortemente com a FP IX. Além disso, e não menos importante, pode contribuir para o desenho racional de novos fármacos.

Referências

-
- 1 NEVES, D. P. *Parasitologia Humana*. 8. ed. São Paulo: Atheneu, 1991. 501 p.
 - 2 ALKADI, H. O. Antimalarial drug toxicity: a review. **Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 385-391, 2007.
 - 3 ALECRIM, M. S. et. al. Resistance of *Plasmodium falciparum* in the Brazilian Amazon to the combination of sulfadoxine and pyrimethamine. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 24, n. 1.,p. 44-47, 1982.
 - 4 MARQUES, A. C. Epidemiological data on malaria in the Amazon region, by municipality, in 1992. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 26, n. 1, p. 43-59, 1993.
 - 5 ALECRIM, M. S.; ALECRIM, W. D.; MACEDO, V. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine (R2) and mefloquine in Brazilian Amazon Region. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n.1, p. 67-68, 1999.
 - 6 IRVIN, J. L.; IRVIN, E. M. Spectrophotometric and potentiometric evaluation of apparent acid dissociation exponents of various 4-aminoquinolines. **Journal of the American Chemical Society**, v. 69, n. 5, p. 1091-1099, 1947.
 - 7 HUFFORD, C. D.; McCHESNEY, J. D.; BAKER, J. K. Assignments of dissociation constants of primaquina by ¹³C-NMR spectroscopy. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 20, p. 273-275, 1983.
 - 8 ROLLO, I. M. Drugs used in the chemotherapy of malaria. In: GILMAN, A. G.; GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **The Pharmacologic Basis of Therapeutics**, New York: Macmillan, 1980. p. 1042-1046.

-
- 9 WHITE, N. J. The treatment of *falciparum* malaria. **Parasitology Today**, v. 4, n. 12, p. 10-14, 1988.
 - 10 O'NEILL, P. M. *et. al.* 4-Aminoquinolines - past, present, and future: a chemical perspective. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 77, n.1, p. 29-58, 1998.
 - 11 SLATER, A. F. G. Chloroquine: mechanism of drug action and resistance in *Plasmodium falciparum*. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 57, n.2-3, p. 203-235, 1993.
 - 12 GINSBURG, H.; GEARY, T. G. Current concepts and new ideas on the mechanism of action of quinoline-containing antimalarials. **Biochemical Pharmacology**, v.36, n.10, p. 1567-1576, 1987.
 - 13 PUSSARD, E.; VERDIER, F. Antimalarial 4-aminoquinolines: mode of action and pharmacokinetics. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 8, n. 1, p. 1-17, 1994.
 - 14 RIDLEY, R. G. Haemoglobin degradation and haem polymerization as antimalarial drug targets. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 49, n. 1, p. 43-48, 1997.
 - 15 MACKENZIE, A. H. Antimalarial drugs for rheumatoid arthritis. **American Journal of Medicine**, v. 75 n. 6A, p. 48-58, 1983.
 - 16 KAYAWAKE, S.; NARBAITZ, R.; KAKO, K. J. Effects of chloroquine and nifedipine on the phospholipid content and enzyme activity in the subcellular fraction of ischemic-rat liver. **Basic Research in Cardiology**, v. 177, n. 2.,p. 140-157, 1982.
 - 17 CLYDE, D. F. Clinical problems associated with the use of primaquine as a tissue schizontocidal and gametocytocidal drug. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 59, n. 3, p. 391-395, 1981.
 - 18 AGARWAL, S. *et. al.* Susceptibility of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient red cells to primaquine enantiomers and two putative metabolites. I. Effect on reduced glutathione, methemoglobin content and release of hemoglobin. **Biochemical Pharmacology**, v. 37, n. 24, p. 4605-4609, 1988.

-
- 19 ARNOLD, J. *et. al.* The antimalarial action of primaquine against the blood and tissue stages of *falciparum* malaria. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 46, n. 3, p. 391-397, 1955.
- 20 KANEKO, A.; NISHIYAMA, T. As drogas e os parasitas. In: PAGE, C. *et. al.* **Farmacologia integrada**. 2. ed. Barueri: Manole, 2004. p. 145-162.
- 21 BIA, F. J. Malaria prophylaxis: taking aim at constantly moving targets. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 65, n. 4, p. 329-336, 1992.
- 22 IDOWU, O. R.; PEGGINS, J. O.; BREWER, T. G. Side-chain hydroxylation in the metabolism of 8-aminoquinoline antiparasitic agents. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 23, n. 1, p. 18-27, 1995.
- 23 TRENHOLME, G. M.; CARSON, P. E. Therapy and prophylaxis of malaria. **Journal of the American Medical Association**, v. 240, n. 21, p. 2293-2295, 1978.
- 24 LUXNAT, M.; GALLA, H. J. Partition of chlorpromazine into lipid bilayer membranes: the effect of membrane structure and composition. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 856, n. 2, p. 274-282, 1986.
- 25 LEE, A. G. Effects of charged drugs on the phase transition temperatures of phospholipids bilayers. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 514, n. 1, p. 95-104, 1978.
- 26 ROONEY, E.K.; LEE, A. G. Binding of hydrophobic drugs to lipid bilayers and to the $(Ca^{2+}+Mg^{2+})$ -ATPase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 732, p. 428-440, 1983.
- 27 MUSTONEN, P.; KINNUNEN, P. K. J. Activation of phospholipase A₂ by adriamycin in vitro. Role of drug-lipid interactions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 6302-6307, 1991.
- 28 NICOLAY, K.; de KRUIJFF, B. Effects of adriamycin on respiratory chain activities in mitochondria from rat liver, rat heart and bovine heart. Evidence for a preferential inhibition of complex III and IV. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 892, p. 320-330, 1987.

-
- 29 MINGEOT-LECLERCQ, M. P.; TULKENS, P. M. Aminoglycosides: nephrotoxicity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 1003-1012, 1999.
- 30 KUMAR, R. *et. al.* Inhibition of rat brain protein kinase C by lipid soluble psychotropics. **Neurochemical Research**, v. 22, p. 1-10, 1997.
- 31 JUTILA, A.; RYTÖMAA, M.; KINNUNEN, P. K. J. Detachment of cytochrome c by cationic drugs from membranes containing acidic phospholipids: comparison of lidocaine, propranolol, and gentamycin. **Molecular Pharmacology**, v. 54, p. 722-732, 1998.
- 32 REASOR, M. J.; KACEW, S. An evaluation of possible mechanisms underlying amiodarone-induced pulmonary toxicity. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 212, p. 297-304, 1996.
- 33 GOORMAGHTIGH, E. *et. al.* Adriamycin inhibits the formation of non-bilayer lipid structures in cardiolipin-containing model membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 685, p. 137-143, 1982.
- 34 KALOYANIDES, G. J. Antibiotic-related nephrotoxicity. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, v. 9, p. 130-134, 1994.
- 35 DRUMMOND, D. C. *et. al.* Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. **Pharmacological Reviews**, v. 51, p. 691-743, 1999.
- 36 KINNUNEN, P. K. J. On the principles of functional ordering in biological membranes. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 57, p. 375-399, 1991.
- 37 BOLARD, J. How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties? **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 864, p. 257-304, 1986.
- 38 BECHINGER, B. Structure and functions of channel-forming peptides: magainins, cecropins, mellitin and alamethicin. **Journal of Membrane Biology**, v. 156, p. 197-211, 1997.

-
- 39 MATSUZAKI, K. Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1376, p. 391-400, 1998.
- 40 MATSUZAKI, K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1462, p. 1-10, 1999.
- 41 OREN, Z.; SHAI, Y. Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides. **Biopolymers**, v. 47, p. 451-463, 1998.
- 42 SHAI, Y. Mechanism of the binding, insertion, and destabilization of phospholipid bilayers membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1462, p. 55-70, 1999.
- 43 SITARAM, N.; NAGARAJ, R. Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: structural and charge requirements for activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1462, p. 29-54, 1999.
- 44 CANTOR, R. S. The lateral pressure profile in membranes: a physical mechanism of general anesthesia. **Biochemistry**, v. 36, p. 2339-2344, 1997.
- 45 RECKTENWALD, D. J.; McCONNELL, H. M. Phase equilibriums in binary mixtures of phosphatidylcholine and cholesterol. **Biochemistry**, v. 20, p. 4505-4520, 1981.
- 46 MARSH, D. ESR probes for structure and dynamics of membranes. In: WATTS, A.; PONT, J. J. H. H. M. **Progress in Protein-Lipid Interactions**. Amsterdam: Elsevier, 1985. p.172-243. v. 1.
- 47 FIELD, K. A.; HOLOWKA, D.; BAIRD, B. FceRI-mediated recruitment of p53/56lyn to detergent-resistant membrane domains accompanies cellular signaling. **The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, p. 9201-9205, 1985.
- 48 LEWIS, R. N. A. H.; McELHANEY, R. N. The mesomorphic phase behavior of lipid bilayers. In: YEAGLE, P. L. **The Structure of Biological Membranes**. Boca Raton: CRC Press, 1992. p. 53-120.

-
- 49 BROWN, D. A.; LONDON, E. Functions of lipid rafts in biological membranes. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 14, p. 111-136, 1998.
- 50 EPAND, R. M. Lipid polymorphism and protein-lipid interactions, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1376, p. 353-368, 1998.
- 51 FEIGENSON, G. W.; BULBOLTZ, J. T. Ternary phase diagram of dipalmitoyl-PC/dilauroyl-PC/cholesterol: nanoscopic domain formation driven by cholesterol. **Biophysical Journal**, v. 80, p. 2775-2788, 2001.
- 52 TILCOCK, C. P. S. *et. al.* Influence of cholesterol on the structural preferences of dioleoylphosphatidylethanolamine-dioleoylphosphatidylcholine systems: a phosphorus-31 and deuterium nuclear magnetic resonance study. **Biochemistry**, v. 21, p. 4596-4601, 1982.
- 53 SEDDON, J. M., CEVC, G. MARSH, D. Calorimetric studies of the gel-fluid (L_{β} - L_{α}) and lamellar-inverted hexagonal (L_{α} - H_{II}) phase transitions in dialkyl- and diacyl phosphatidylethanolamines. **Biochemistry**, v. 22, p. 1280-1281, 1983.
- 54 GRUNER, S. M. Intrinsic curvature hypothesis for biomembrane lipid composition: a role for nonbilayer lipids. **The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, p. 3665-3669, 1985.
- 55 ELLENS, H.; BENTZ, J.; SZOBA, F. C. Fusion of phosphatidylethanolamine-containing liposomes and mechanism of L_{α} - H_{II} phase transition. **Biochemistry**, v. 25, p. 4141-4147, 1986.
- 56 KRISHNA, Y. V. S. R.; MARSH, D. Spin label ESR and ^{31}P -NMR studies of the cubic and inverted hexagonal phases of dimyristoylphosphatidylcholine/myristic acid (1:2, mol/mol) mixtures. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1024, p. 89-94, 1990.
- 57 RAMASWAMI, V. *et. al.* Opioid Peptide interactions with lipid bilayer membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1109, p. 195-202, 1992.

-
- 58 LIU, S. *et. al.* Investigation of interaction of Leu-enkephalin with lipid membranes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 48, p. 148-158, 2006.
- 59 LIM, L. Y.; GO, M. L. The antimalarial agent halofantrine perturbs phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine bilayers: a differential scanning calorimetric study. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 47, p. 732-737, 1999.
- 60 HUBBELL, W. L.; McCONNELL, H. M. Molecular motion in spin-labeled phospholipid and membranes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 93, n. 2, p. 314–326, 1971.
- 61 FREED, J. H. Molecular rotational dynamics in isotropic and oriented fluids studies by ESR. In: DORFMULLER, T.; PECORA, R. **Rotational Dynamics of Small and Macromolecules in Liquids**, Berlin: Springer-Verlag, 1987. p. 89-142.
- 62 SHIN, Y. K. *et. al.* Colicin-e1 binding to membranes – time-resolved studies of spin labeled mutants. **Science**, v. 259, p. 960-963, 1993.
- 63 BIAGGI, M. H.; RISKE, K. A.; LAMY-FREUND, M. T. Melanotropic peptides-lipids bilayer interaction. Comparison of the hormone α -MSH to biologically more potent analog. **Biophysical Chemistry**, v. 67, p. 139-149, 1997.
- 64 HUBBELL, W. L.; CAFISO, D. S.; ALTENBACH, C. Identifying conformational changes with site-directed spin labeling. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 7, p. 735-739, 2000.
- 65 BORBAT, P. P. *et. al.* Electron spin resonance in studies of membranes and proteins. **Science**, v. 291, p. 266-269, 2001.
- 66 SUBCZYNSKI, W. K. *et. al.* Effects of probucol on phase transition and fluidity of phosphatidylcholine membranes: a spin label study. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 55, p. 1-11, 1994.
- 67 SCHNEIDER, D. J.; FREED, J. H. Calculating slow motional magnetic resonance spectra: a user's guide. In: BERLINER, L. J.; REUBEN, J. **Biological magnetic resonance**. New York: Plenum Publishing, 1989. p. 1-76. v.8

-
- 68 GAMLIEL, D.; FREED, J. H. Theory of two-dimensional ESR with nuclear modulation. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 89, p. 60-93, 1990.
- 69 BUDIL, D. E. *et. al.* Nonlinear-least-squares analysis of slow-motion EPR spectra in one and two dimensions using a modified Levenberg-Marquardt algorithm. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 120, n.2, p. 155-189, 1996.
- 70 SHIN, Y. K.; FREED, J. H. Dynamic imaging of lateral diffusion by electron spin resonance and study of rotational dynamics in model membranes. effect of cholesterol. **Biophysical Journal**, v. 55, n. 3. p. 537-550, 1989.
- 71 GE, M. *et. al.* Electron spin resonance characterization of liquid ordered phase of detergent-resistant membranes from RBL-2H3 cells. **Biophysical Journal**, v. 77, n. 2, p. 925-933, 1999.
- 72 FREED, J. H. New technologies in electron spin resonance. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 51, p. 655-689, 2000.
- 73 ALBON, N.; STURTEVANT, J. Nature of the gel to liquid crystal transition of synthetic phosphatidylcholines. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 75, n. 5, p. 2258-2260, 1978.
- 74 MARSH, D.; WATTS, A.; KNOWLES, P. F. Cooperativity of the phase transition in single- and multilayer lipid vesicles. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 465, p. 500-514, 1977.
- 75 FREIRE, E.; BILTONEN, R. Estimation of molecular averages and equilibrium fluctuations in lipid bilayer systems from the excess heat capacity function. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 514, p. 54-68, 1978.
- 76 KANEHISA, M.; TSONG, T. Y. Cluster model of lipid phase transitions with application to passive permeation of molecules and structure relaxations in lipid bilayers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 100, n. 2, p. 424-432, 1978.
- 77 AXEL, F. S. Biophysics with nitroxyl radicals. **Biophysics of Structure and Mechanism**, v. 2, n. 3, p.181-218, 1976.

-
- 78 FORRESTER, A. R.; THOMSON, R. H. Stable nitroxide radicals. **Nature** , v. 203, n. 4940, p. 74-75, 1964.
- 79 LUCKURST, G. R. Biradicals as spin probes. In: BERLINER, L. J. **Spin labeling: theory and applications**. New York: Academic Press, 1976. p. 133-181.
- 80 CAMPBELL, I. D.; DWEK, R. A. **Biological Spectroscopy**. Menlo Park: The Benjamin/Cummings Publishing Company, 1984.
- 81 NORDIO, P. L. General magnetic resonance theory. In: BERLINER, L. J. **Spin labeling: theory and applications**. New York: Academic Press, 1976. p. 5-52.
- 82 MARSH, D. Electron spin resonance: spin labels. In: GRELL, E. **Membrane spectroscopy**. New York: Springer-Verlag, 1981. p. 51-142.
- 83 KNOWLES, P. F.; MARSH, D.; RTTLE, H. W. E. **Magnetic resonance of biomolecules**. New York: John Wiley and Sons, 1976.
- 84 TURCHIELLO, R. F. *et. al.* How bradykinin alters the lipid membrane structure: a spin label comparative study with bradykinin fragments and other cations. **Biopolymers**, v. 54, n. 3, p. 211-221, 2000.
- 85 GAFFNEY, B. J. Practical considerations for the calculation of order parameters for fatty acid or phospholipid spin labels in membranes. In: BERLINER, L. J. **Spin labeling: theory and applications**. New York: Academic Press, 1976. p. 567-571.
- 86 GRIFFITH, O. H.; JOST, P. C. Lipid spin labels in biological membranes. In: BERLINER, L. J. **Spin labeling: theory and applications**. New York: Academic Press, 1976. p. 453-523.
- 87 FREED, J. H. Theory of slow tumbling ESR spectra for nitroxides. In: BERLINER, L. J. **Spin labeling: theory and applications**. New York: Academic Press, 1976. p. 53-132.

-
- 88 KUBO, R. A. Stochastic theory of lineshape. In: SHULER, K. E. **Stochastic processes in chemical physics, advances in chemical physics**. New York: Wiley, 1969. p. 101-127.
- 89 FREED, J. H.; BRUNO, G. V.; POLNASZEK, C. F. Electron spin resonance lineshapes and saturation in the slow motional region. **Journal of Physical Chemistry**. v. 75, n. 22, p. 3385-3399, 1971.
- 90 FREED, J. H. ESR relaxation and lineshapes from the generalized cumulant and relaxation matrix viewpoint. In: MUUS, L. T.; ATKINS, P. W. **Electron spin relaxation in liquids**. New York: Plenum, 1972. p. 165-191.
- 91 FREED, J. H. ESR lineshapes and saturation in the slow motional region. the stochastic liouville approach. In: MUUS, L. T.; ATKINS, P. W. **Electron spin relaxation in liquids**. New York: Plenum, 1972. p. 387-409.
- 92 GLARUM, S. H.; MARSHALL, J. H. ESR of the perinaphtheryl radical in a liquid crystal. **Journal of Chemical Physics**, v. 44, n. 8, p. 2884-2890, 1966.
- 93 GLARUM, S. H.; MARSHALL, J. H. Paramagnetic Relaxation in Liquid-crystal Solvents. **Journal of Chemical Physics**, v. 46, n. 1, p. 55-62, 1967.
- 94 FAVRO, L.D. Rotational brownian motion. In: BURGESS, R. E. **Fluctuation phenomena in solids**. New York: Academic Press, 1965. p. 79-101.
- 95 POLNASZEK, C. F.; FREED, J. H. ESR studies of anisotropic ordering, spin relaxation and slow tumbling in liquid crystalline solvents. **Journal of Physical Chemistry**, 79, n. 21, p. 2283-2306 1975.
- 96 POLNASZEK, C.F. **An ESR Study of Rotational Reorientation and Spin Relaxation in Liquid Crystal Media**. 1975. Thesis (Ph.D.) - Cornell University, 1975.
- 97 MEIROVITCH, E.; NAYEEM, A.; FREED, J. H. Analysis of protein-lipid interactions based on model simulations of electron spin resonance spectra. **Journal of Physical Chemistry**, v. 88, n.16, p. 3454-3465, 1984.

-
- 98 RISKE, K. A. *et. al.* Temperature and ionic strength dependent light scattering of DMPG dispersions. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 89, n. 1, p. 31-44, 1997.
- 99 LEWIS, R. N. A. H.; MAK, N.; McELHANEY, R. N. Differential scanning calorimetric study of the thermotropic phase behavior of model membranes composed of phosphatidylcholines containing linear saturated fatty acyl chains. **Biochemistry**, v. 26, p. 6118-6126, 1987.
- 100 ANDRUSHCHENKO, V. V.; VOGEL, H. J.; PRENNER, E. J. Interactions of tryptophan-rich cathelicidin antimicrobial peptides with model membranes studied by differential scanning calorimetry. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1768, p. 2447-2458, 2007.
- 101 KISS, M.; BELÁGYI, J.; LŐRINCZY, D. DSC and EPR study on AMP.PNP, BeFx and AlF₄ containing myosin nucleotide complexes. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 72, p. 565-572, 2003.
- 102 de VRIES, A. H. *et. al.* Molecular structure of the lecithin ripple phase. **The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 15, p. 5392-5396, 2005.
- 103 ZHANG, Y. P. *et. al.* Interaction of a peptide model of a hydrophobic transmembrane alpha-helical segment of a membrane protein with phosphatidylcholine bilayers: differential scanning calorimetric and FTIR spectroscopic studies. **Biochemistry**, v. 31, p. 11579-11588, 1992.
- 104 CEVC, G.; WATTS, A.; MARSH, D. Titration of the phase transition of phosphatidylserine bilayer membranes. Effects of pH, surface electrostatics, ion binding and headgroup hydration. **Biochemistry**, v. 20, p. 4955-4965, 1981.
- 105 SCHINDLER, H.; SEELIG, J. EPR spectra of spin labels in lipid bilayers. **Journal of Chemical Physics**, v. 59, p. 1841-1850, 1973.
- 106 FERRARINI, A. *et. al.* A theoretical model of phospholipid dynamics in membranes. **Journal of Chemical Physics**, v. 91, p. 5707-5721, 1989.

-
- 107 EARLE, K. A. *et. al.* 250-GHz Electron spin resonance studies of polarity gradients along the aliphatic chains in phospholipid membranes. **Biophysical Journal**, v. 66, p. 1213-1221, 1994.
- 108 CITADINI, A. P. S. *et. al.* EPR studies of chlorocatechol 1,2-dioxygenase: evidences of iron reduction during catalysis and of the binding of amphipatic molecules. **Biophysical Journal**, v. 88, n. 5, p. 3502–3508, 2005.
- 109 KAR, L.; NEY-IGNER, E.; FREED, J. H. Electron spin resonance and electron-spin-echo study of oriented multilayers of La-dipalmitoylphosphatidylcholine water system. **Biophysical Journal**, v. 48, n. 4, p. 569–595, 1985.
- 110 SHIN, Y. K.; FREED, J. H. Thermodynamics of phosphatidylcholine-cholesterol mixed model membranes in the liquid crystalline state studied by the orientational order parameter. **Biophysical Journal**, v. 56: n. 3, p. 1093–1100, 1989.
- 111 GE, M.; FREED, J. H. Electron-spin resonance study of aggregation of Gramicidin in dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers and hydrophobic mismatch. **Biophysical Journal**, v. 76, n. 1, p. 264–280, 1999.
- 112 PERUSSI, J. R. *et. al.* Interaction of primaquine and chloroquine with ionic micelles as studied by ^1H NMR and electronic absorption spectroscopy. **Physiological Chemistry & Physics & Medical NMR**, v. 27, n. 1, p. 1-15, 1995.
- 113 GINSBURG, H.; KRUGLIAK, M. Effects of quinoline-containing antimalarials on the erythrocyte membrane and their significance to drug action on *Plasmodium falciparum*. **Biochemical Pharmacology**, v. 37, n. 10, p. 2013–2018, 1988.
- 114 GINSBURG, H.; DEMEL, R. A. The effect of protoporphyrin IX and chloroquine on phospholipid monolayer and the possible implications to antimalarial activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 732, n. 1, p. 316–319, 1983.
- 115 KURSCH, B.; LÜLLMAN, H.; MOHR, K. Influence of various cationic amphiphilic drugs on the phase transition temperature of phosphatidylcholine liposomes. **Biochemical Pharmacology**, v. 32, n. 17, p. 2589–2594, 1983.

-
- 116 ZIDOVETZKI, R. *et al.* A nuclear magnetic resonance study of the interactions of the antimalarials chloroquine, quinacrine, quinine and mefloquine with dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 35, n. 3, p. 199–208, 1989.
- 117 ZIDOVETZKI, R. *et al.* A nuclear magnetic resonance study of the interactions of the antimalarials chloroquine, quinacrine, quinine and mefloquine with lipids extracted from normal human erythrocytes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 38, n. 1, p. 33–40, 1990.
- 118 ZIDOVETZKI, R. *et al.* Chloroquine stabilization of phospholipid membranes against diacylglycerol-induced perturbation. **Biochemical Pharmacology**, v. 45, n. 1, p. 183–189, 1993.
- 119 GINSBURG, H.; KRUGLIAK, M. Chloroquine – some open questions on its antimalarial mode of action and resistance. **Drug Resistance Updates**, v. 2, n. 2, p. 180–187, 1999.
- 120 FOLEY, M.; TILLEY, L. Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance. **International Journal of Parasitology**, v. 27, n. 2, p. 231–240, 1997.
- 121 FOLEY, M.; TILLEY, L. Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance and prospects for new agents. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 79, n. 1, p. 55–87, 1998.
- 122 FITCH, C. D. Ferriprotoporphyrin IX, phospholipids, and the antimalarial actions of quinoline drugs. **Life Sciences**, v. 74, n. 16, p. 1957–1972, 2004.
- 123 TAPPEL, A. L. Unsaturated lipid oxidation catalyzed by hematin compounds. **Journal of Biological Chemistry**, v. 217, p. 721–733, 1955.
- 124 SLATER, A. *et al.* An iron-carboxylate bond links the heme units of malaria pigment. **The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n.2, p. 325–329, 1991.
- 125 ATAMNA, H.; GINSBURG, H. Heme degradation in the presence of glutathione – A proposed mechanism to account for the high levels of non-heme iron found in the membranes of hemoglobinopathic red blood cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 42, p. 24876–24883, 1995.

-
- 126 ORJIH, A. U. *et. al.* Hemin lyses malaria parasites. **Science**, v. 214, n. 4521, p. 666-669, 1981.
- 127 CHOU, A. C.; CHEVLI, R.; FITCH, C. D. Ferriprotoporphyrin IX fulfills the criteria for identification as the chloroquine receptor of malaria parasites. **Biochemistry**, v. 19, n. 8, p. 1543-1549, 1980.
- 128 SUGIOKA, Y. *et. al.* A ferriprotoporphyrin IX-chloroquine complex promotes membrane phospholipid peroxidation. **FEBS Letters**, v. 223, n. 2, p. 251-254, 1987.
- 129 TIPPING, E.; KETTERER, B.; CHRISTODOULIDES, L. Interaction of small molecules with phospholipid bilayers. Binding to egg phosphatidyl choline of some organic anions (bromosulphophtalein, oesterone sulphate, haem, and bilirubin) that bind to ligandin and aminoazo-dye-binding A. **Biochemical Journal**, v. 180, n. 2, p. 327-337, 1979.
- 130 FAMIN, O.; KRUGLIAK, M.; GINSBURG, H. Kinetics of inhibition of glutathione-mediate degradation of ferriprotoporphyrin ix by antimalarial drugs. **Biochemical Pharmacology**, v. 58, n. 1, p. 59-68, 1999.
- 131 DEGOWIN, R. L. *et. al.* The haemolytic effects of diaphenylsulfone (DDS) in normal subjects and in those with glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 35, n. 2, p. 165-179, 1966.
- 132 DERN, R. J.; BEUTLER, E.; ALVING, A. S. The hemolytic effect of primaquine. V. Primaquine sensitivity as a manifestation of a multiple drug sensitivity. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 45, n.1 p. 30-39, 1955.
- 133 COHEN, G.; HOCHSTEIN, P. Generation of hydrogen peroxide in erythrocytes by hemolytic agents. **Biochemistry**, v. 3, n.7, p. 895-900, 1964.
- 134 HOLTZMAM, J. L. Role of reactive oxygen and metabolite binding in drug toxicity. **Life Sciences**, v. 30, n. 1, p. 1-9, 1981.
- 135 BOWMAN, Z. S. *et. al.* Primaquine-induced hemolytic anemia: role of membrane lipid peroxidation and cytoskeletal protein alterations in the hemotoxicity of 5-

-
- hydroxyprimaquine. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 314, n. 2, p. 838–845, 2005.
- 136 BOLCHOZ, L. J. C. *et. al.* Primaquine-induced hemolytic anemia: formation of free radicals in rat erythrocytes exposed to 6-methoxy-8-hydroxylaminoquinoline. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 303, n. 3, 2002.
 - 137 VÁSQUEZ-VIVAR, J.; AUGUSTO, O. Hydroxylated metabolites of the antimalarial drug primaquine. oxidation and redox cycling. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 10, p. 6848-6854, 1992.
 - 138 CARSON, P. E. *et. al.* Toxicology of the 8-aminoquinolines and genetic factors associated with their toxicity in man. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 59, n.3,p. 427-437, 1981.
 - 139 STROTHER, A. *et. al.* Metabolism of 8-amonoquinoline antimalarial agents. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 59, n.3, p. 413-425, 1981.
 - 140 CHEVLI, R.; FITCH, C. D. The antimalarial drug mefloquine binds to membrane phospholipids. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 21, n. 4, p. 581-586, 1982.
 - 141 SINGH, K. K.; VINGKAR, S. K. Formulation, antimalarial activity and biodistribution of oral lipid nanoemulsion of primaquine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 347, n. 1-2, p. 136–143, 2008.
 - 142 STENSRUD, G. *et. al.* Formulation and characterisation of primaquine loaded liposomes prepared by a pH gradient using experimental design. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 198, n. 2, p. 213–228, 2000.
 - 143 MAGUIRE, P. A.; SHERMAN, I. W. Phospholipid composition, cholesterol content and cholesterol exchange in Plasmodium falciparum-infected red cells. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 38, n. 1, p. 105-112, 1990.
 - 144 BEAUMELLE, B. D.; VIAL, H. J. Modification of the fatty acid composition of individual phospholipids and neutral lipids after infection of the simian erythrocyte by *Plamodium knowlesi*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 877, n. 2, p. 262-270, 1986.

-
- 145 VIAL, H. J.; PHILIPPOT, J. R.; WALLACH, D. F.H. A re-evaluation of the status of cholesterol in erythrocytes infected by *Plamodium knowlesi* and *P. falciparum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 13, n. 1, p. 53-65, 1984.
- 146 HSIAO, L. L. *et. al.* Modification of host cell membrane lipid composition by the intra-erythrocytic human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Biochemical Journal**, v. 274, n. 1, p. 121-132, 1991.
- 147 WUNDERLICH, F. *et. al.* Distinct lipid compositions of parasite and host cell plasma membranes from *Plasmodium chabaudi*-infected erythrocytes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 44, n. 2, p. 271-278, 1991.