



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

ÉDER JÉFERSON SOUZA CARDOSO

**Estudo das interações dos surfactantes iônicos SDS, CTAC e HPS
e miltefosina com membranas de leishmania, macrófagos e
eritrócitos**

GOIÂNIA
2023



**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES
E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estado de caso ou Enfoque teórico ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

Éder Jefferson Souza Cardoso

3. Título do trabalho

Estudo das interações dos surfactantes iônicos SDS, CTAC e HPS e miltefosina com membranas de leishmania, macrófagos e eritrócitos

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);
 - b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.
- O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Éder Jefferson Souza Cardoso, Discente**, em 01/10/2023, às 18:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Alonso, Professor do Magistério Superior**, em 03/10/2023, às 21:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_externo=0, informando o código verificador 4073324 e o código CRC E89BE2F5.

ÉDER JÉFERSON SOUZA CARDOSO

Estudo das interações dos surfactantes iônicos SDS, CTAC e HPS e miltefosina com membranas de leishmania, macrófagos e eritrócitos

Dissertação apresentada ao programa à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás como exigência para obtenção do Título de Mestre em Física.

Área de Concentração: Física

Orientador: Prof. Dr. Antonio Alonso

**GOIÂNIA
2023**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Cardoso, Eder Jeferson Souza
[manuscrito] / Eder Jeferson Souza Cardoso. - 2023.
vi, 95 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Alonso.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Física (IF), Programa de Pós-Graduação em Física, Goiânia, 2023.

Bibliografia.
Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Surfactante. 2. Miltesfosina . 3. Eritrócito. 4. Fluidez da Membrana . 5. Ressonância Paramagnética Eletrônica. I. Alonso, Antonio, orient. II. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE FÍSICA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº 214 da sessão de Defesa de Dissertação de Éder Jéferson Souza Cardoso, que confere o título de Mestre em Física, na área de concentração em Física.

Aos 18 dias do mês de setembro de 2023, a partir das 09h00min, no Laboratório de Mídias do Instituto de Física, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada "Estudo das interações dos surfactantes iônicos SDS, CTAC e HPS e miltefosina com membranas de leishmania, macrófagos e eritrócitos". Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, Professor Doutor Antonio Alonso (IF/UFG), com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Doutor Kleber Santiago Freitas e Silva (FarmaTec/UFG), membro titular externo; e Professor Doutor Sebastião Antônio Mendanha Neto (IF/UFG), membro titular interno. Durante a arguição, os membros da banca não fizeram sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido o candidato aprovado pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Professor Doutor Antonio Alonso, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos membros da Banca Examinadora, aos 18 dias do mês de setembro de 2023.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

Documento assinado eletronicamente por Antonio Alonso, Professor do Magistério Superior, em 18/09/2023, às 11:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Sebastiao Antonio Mendanha Neto, Professor do Magistério Superior, em 18/09/2023, às 11:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Kleber Santiago Freitas e Silva, Usuário Externo, em 18/09/2023, às 11:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orcao_acesso_externo=0, informando o código verificador 4043731 e o código CRC D669E5DC.

Referência: Processo nº 23070.052648/2023-38

SEI nº 4043731

À minha amada Anne Kíssia.

Agradecimentos

- ❖ À minha amada Anne Kíssia, por estar sempre ao meu lado nos momentos difíceis e me apoiar sempre em ir mais longe, que mesmo que distante neste momento, ainda continua a ser essencial na realização deste trabalho.
- ❖ Ao Dr. Alonso, pelas oportunidades de ser seu assistente e pelos ensinamentos ao longo desta caminhada.
- ❖ À Dra. Lais Alonso, pela imensa ajuda e conselhos, que me incentivaram a continuar trilhando o caminho científico.
- ❖ Ao Dr. Sebastião, pelos ensinamentos, ajuda nos experimentos e pela paciência.
- ❖ À Dra. Míriam Dorta, por ceder seu laboratório, pelos ensinamentos e pelos incentivos.
- ❖ A Universidade Federal de Goiás e ao Instituto de Física pelas oportunidades.

Sumário

Agradecimentos	viii
Prefácio	xi
Resumo	xii
Abstract	xiii
1. Introdução	14
1.1 Considerações Gerais.....	14
1.2 Leishmaniose Tegumentar Americana	15
1.2.1 Quadro Clínico.....	16
1.2.2 Diagnóstico	17
1.2.3 Tratamento	18
1.2.4 Medidas Profiláticas.....	18
1.2.5 Transmissão	19
1.3 Lutzomyia e Leishmania.....	20
1.4 Membrana Plasmática.....	22
1.5 Macrófagos	26
1.5.1 Interação Macrófago-Leishmania	29
1.6 Sangue.....	30
1.7 Surfactantes.....	31
1.8 Miltefosina	33
2. Objetivos.....	35
2.1 Objetivos Gerais	35
2.2 Objetivos Específicos	35
3. Técnicas Experimentais	36
3.1 Espectrofotometria de absorção molecular no UV/vis (EAM).....	36
3.2. Espectroscopia de Ressonância Paramagnética (RPE).....	38
3.2.1. Introdução	38
3.2.2 Conceitos básicos e Efeito Zeeman	41
3.2.3 Processos de Relaxação	44
3.2.4 Fator de Landé	46

3.2.5	Interação Nuclear Hiperfina.....	47
3.2.6	O método do marcador de Spin	49
3.2.7	Anisotropia Espectral.....	52
3.3.	Citometria de Fluxo	55
4.	Materiais e Métodos	56
4.1	Reagentes Químicos	56
4.2	Parasitas	56
4.3	Macrófagos J774.A1	57
4.4	Viabilidade Celular pelo Teste de MTT nos parasitas.....	58
4.5	Viabilidade Celular pelo Teste de MTT nos macrófagos	59
4.6	Potencial Hemolítico em PBS	60
4.7	Potencial Hemolítico em sangue integral	61
4.8	Preparação e marcação das amostras (RPE).....	61
5.	Resultados	62
5.1	Ação dos surfactantes e MT nos eritrócitos	62
5.1.1	Efeitos na dinâmica molecular avaliados por RPE.....	62
5.1.2	Os efeitos no potencial hemolítico são dependentes da concentração celular ...	66
5.1.3	Considerações Finais	70
5.2	Ação dos surfactantes e MT nos parasitas de Leishmania	71
5.2.1	Efeitos na dinâmica molecular da membrana avaliados por RPE.....	71
5.2.2	As concentrações antiproliferativas e citotóxicas dos compostos são dependentes da concentração de células usadas no ensaio	74
6.	Conclusões	82
7.	Perspectivas.....	83
8.	Referências Bibliográficas	84

Prefácio

O trabalho que segue foi desenvolvido com o intuito de elucidar os mecanismos de ação dos surfactantes iônicos SDS, CTAC e HPS e comparar os efeitos com a Miltefosina, fármaco já conhecido no combate à Leishmaniose, mas com mecanismo de ação ainda não completamente compreendido. Os resultados foram catalogados e compilados, resultando em dois artigos publicados na revista científica *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* intitulados *Interactions of miltefosine with erythrocyte membrane proteins compared to those of ionic surfactants* e *Antileishmanial and cytotoxic activities of ionic surfactants compared to those of miltefosine*.

Resumo

A miltefosina (MT) é um fármaco oral aprovado internacionalmente para tratamento da leishmaniose, no entanto, seu mecanismo de ação ainda não está bem estabelecido. Entender o mecanismo de ação de compostos com atividade leishmanicida é importante para ajudar na procura de novos protótipos de fármacos com maior atividade e menores efeitos colaterais. Surfactantes são compostos largamente utilizados pela indústria na fabricação de sabão, xampus e outros cosméticos. São geralmente classificados de acordo com a carga molecular, podendo ser não iônico, aniônico, catiônico ou zwitteriônico (ou anfótero) no caso de apresentar carga positiva e negativa no mesmo composto. A espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) associada ao método de marcadores de spin foi utilizada para comparar as interações da MT e dos surfactantes Dodecil Sulfato de Sódio (SDS, aniônico), Cloreto de Cetil Trimetil Amônio (CTAC, catiônico) e N,N-dimetil-3-amônio-1-propanosulfonato (HPS, zwitteriônico) com as membranas de eritrócito, *Leishmania (L.) amazonensis*, e macrófago. Todos os compostos aumentaram a dinâmica molecular das proteínas de membrana, no entanto, o SDS causou o menor aumento na dinâmica de membrana do eritrócito e parasita e também foi o menos efetivo na atividade antileishmania e citotoxicidade nos macrófagos J774.A1. Também mostrou o menor potencial hemolítico tanto em PBS quanto no sangue integral. Em plasma sanguíneo, foi detectada rigidez na albumina causada por 2,5 mM de SDS, devido às interações eletrostáticas e hidrofóbicas do composto com a proteína. O CTAC não apresentou diferenças significativas em relação aos outros compostos, mas em concentrações celulares mais altas ($> 1 \times 10^9$ células/ml), apresentou alta atividade contra as formas promastigotas da *L. amazonensis*, além de ser o mais citotóxico aos macrófagos J774.A1. Para todos os experimentos realizados, as moléculas zwitteriônicas HPS e MT não apresentaram diferenças significativas entre si. Os dados sugerem a possibilidade de se usar surfactantes catiônicos ou zwitteriônicos em formulações contendo leishmanicidas, visando o tratamento da leishmaniose cutânea.

Palavras-chave: Surfactante, Miltefosina, Eritrócito, Fluidez da Membrana, Ressonância Paramagnética Eletrônica

Abstract

Miltefosine (MT) is an internationally approved oral drug for the treatment of leishmaniasis, however, its mechanism of action is not yet well established. Understanding the mechanism of action of compounds with leishmanicidal activity is important to help in the search for new drug prototypes with greater activity and fewer side effects. Surfactants are compounds widely used in the industry in the manufacture of soap, shampoos and other cosmetics. They are usually classified according to the molecular charge, and may be nonionic, anionic, cationic or zwitterionic (or amphoteric) when they have a positive and negative charge in the same compound. Electron Paramagnetic Resonance (EPR) spectroscopy associated with the spin-label method was used to compare the interactions of MT and the surfactants Sodium Dodecyl Sulfate (SDS, anionic), Cetyl Trimethyl Ammonium Chloride (CTAC, cationic) and N, N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate (HPS, zwitterionic) with the membranes of *Leishmania (L.) amazonensis*, erythrocyte and macrophage. All compounds increased the molecular dynamics of membrane proteins; however, SDS caused the smallest increase in parasite and erythrocyte membrane dynamics and was also the least effective in antileishmanial activity, cytotoxicity in macrophages J774.A1 and hemolytic potential in both PBS and whole blood. It was detected, in blood plasma, the albumin stiffness caused by 2.5 mM SDS due to the electrostatic and hydrophobic interactions of the compound with the protein. CTAC did not show significant differences in relation to the other compounds, but at higher cell concentrations ($> 1 \times 10^9$ cells/mL), it showed high activity against the *L. amazonensis* promastigotes, besides being the most cytotoxic to macrophages J774.A1. For all the experiments, the zwitterionic molecules HPS and MT did not present significant differences between them. The data suggest the possibility of using cationic or zwitterionic surfactants in formulations containing leishmanicides, aiming at the treatment of cutaneous leishmaniasis.

Keywords: Surfactant, Miltefosine, Erythrocyte, Membrane fluidity, Electron paramagnetic resonance

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

Presente preferencialmente em países subdesenvolvidos de clima tropical como Etiópia, Brasil e Índia, a Leishmaniose é uma das principais causas de enfermidades e mortes em nações de baixo investimento em saúde e saneamento básico. Ainda assim, pela facilidade de sua transmissão e contágio e adaptação ao ambiente em que se encontra a Leishmaniose já é uma doença presente em quase 100 países em todos os continentes, com exceção da Oceania, incluindo EUA e países do leste europeu, tendo estas regiões alguns casos oriundos do fluxo de imigrantes e turistas vindo de regiões africanas e latino-americanas. No ano de 2020, regiões como América do Sul, leste africano, mediterrâneo e Ásia Meridional, representaram mais de 90% dos casos registrados pela OMS [1].

Em um contexto histórico, o surgimento da doença é incerto, mas evidências datam a enfermidade do período dos incas no Peru, onde achados arqueológicos deste período descrevem deformidades semelhantes às resultantes de úlceras nas narinas e lábios humanos devido à forma cutânea da doença. Com isto, a Leishmaniose Tegumentar Americana é considerada oriunda do continente sul-americano [2].

No ano de 2020 na América Latina, o Brasil foi o país com maior incidência com 16.432 casos confirmados, acompanhado por 6.161 casos na Colômbia, 4.178 casos no Peru, 3443 casos na Nicarágua e 2.059 casos na Bolívia, totalizando nestes países, 81% das infecções registradas na América Latina [3]. Em 2019 no estado de Goiás, foram notificados 550 casos de Leishmaniose, apresentando as cidades de Niquelândia, Alto Paraíso de Goiás, Baliza, Bom Jardim de Goiás, Goiânia e Uruaçu [4].

O ciclo natural da leishmaniose afeta somente animais, no entanto pode acidentalmente afetar seres humanos, classificando esta enfermidade como uma antropozoonose. De suas ramificações, temos a Leishmaniose Visceral, forma grave e rara da doença, que compromete principalmente órgãos como baço, fígado e medula óssea. Em alguns países esta forma é popularmente conhecida como Calazar. A forma mais comum da doença apresenta danos à pele do hospedeiro, sendo conhecida como Leishmaniose Cutânea, a qual pode evoluir e atingir as regiões mucosas do hospedeiro, sendo nomeada de Leishmaniose Mucocutânea. Estas duas últimas, formam uma única categoria conhecida

como Leishmaniose Tegumentar e a junção de todas estas, a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) [5].

1.2. Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

Caracterizada como um conjunto de enfermidades e ramificações de danos causados por protozoários em comum, a LTA é uma enfermidade infecciosa não contagiosa, causada por mais de 20 espécies de parasitas do gênero *Leishmania*. O hospedeiro varia de espécie para espécie, partindo desde pequenos roedores a mamíferos de porte considerável. Já o vetor responsável pela sua propagação é proveniente de diferentes mosquitos flebótomos, variando o gênero e espécie a depender da espécie do protozoário envolvida [5].

Dentre estas espécies, as mais importantes no Brasil são *Leishmania amazonensis*, *Leishmania guyanensis* e *Leishmania braziliensis*. A primeira encontra-se distribuída amplamente em território nacional, alcançando a maioria das regiões do país com exceção do sul, atingindo o sudeste do Maranhão, Tocantins, Pará, Rondônia e Amazonas, principalmente em regiões cobertas por florestas úmidas. Representando o nordeste neste contexto temos o estado da Bahia, já no sudeste São Paulo e Minas Gerais são os principais estados e por fim Goiás na região Centro-Oeste do país. Dentre seus hospedeiros preferenciais, encontram-se pequenos roedores dos gêneros *Proechimys* e *Oryzomys*. Seu vetor é o mosquito *Lutzomyia*, apresentando-se nas espécies *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia reducta* e *Lutzomyia olmeca nociva*, todas com hábitos noturnos e voo baixo, além de em raros casos, apresentar hematofagia em seres humanos [5]

A *Leishmania guyanensis*, limita-se ao norte da bacia amazônica, afetando os estados brasileiros de Roraima, Amazonas, Pará e Amapá, além de afetar países vizinhos como as Guianas. Seu ambiente preferencial é a floresta tropical ombrófila submontana, caracterizada uma formação vegetal cujo desenvolvimento depende do regime de águas pluviais abundantes e constantes, regiões nas quais não sofrem alagamentos, também conhecidas como floresta de terra firme. Assim como a *Leishmania amazonensis*, também apresenta pequenos roedores como principais à sua infecção, além de marsupiais complementando os hospedeiros de pequeno porte. No entanto mamíferos de porte considerável como tamanduás e o bicho preguiça também estão presentes no catálogo deste protozoário, valendo ressaltar que muitas das vezes em que tais hospedeiros encontram-se infectados, os mesmos não apresentam os sintomas da doença, estando o parasita alojado na pele e vísceras do mamífero. Seu vetor

também é do gênero do *Lutzomyia*, apresentando o *Lutzomyia umbratilis* como protagonista, além dos *Lutzomyia anduzei*, *Lutzomyia whitmani*. Diferentemente do vetor citado anteriormente, esta espécie tem hábitos diurnos repousando em tronco de árvores, além de atacar seres humanos em conjunto, em situações em que se sente ameaçado [6].

E por último a *Leishmania braziliensis*, o qual possui forte representatividade na região nordeste e sul do Pará, alcançando áreas da Amazônia Oriental e também o centro-sul do Brasil. Dentre as espécies citadas é a que apresenta maior número de hospedeiros possíveis, tendo sido encontrada nos roedores *Nectomys squamipes* (chamado geralmente de rato d'água) e *Bolomys lasiurus* (conhecido popularmente como pixuna ou rato do rabo peludo). Contudo, seus hospedeiros preferenciais são mamíferos de médio porte, afetando principalmente animais domésticos, valendo destacar cães e equinos, nos quais abrigam o parasita em quantidade expressiva. Possui subdivisões interessantes em seus vetores, a depender do local onde tal parasita está presente [6].

Em ambientes silvestres, um dos principais vetores são os mosquitos do gênero *Lutzomyia*, de hábitos diurnos e apresentando elevada hematofagia em seres humanos, além de demonstrar elevada atividade em períodos chuvosos, representado pelas espécies *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia intermedia* e *Lutzomyia migonei*, geralmente estando localizadas em ambientes rurais modificados pelo homem [6].

1.2.1 Quadro clínico

A apresentação clínica da doença é subdividida em duas formas padrões: Leishmaniose Cutânea e Leishmaniose Visceral. A primeira manifesta-se principalmente em tecidos epidérmicos, ocorrendo lesões ulcerosas na pele que podem ser localizadas na região da picada do mosquito ou espalhar para outras regiões. A depender de fatores como a espécie do parasita envolvida na infecção e resposta imune do hospedeiro, a Leishmaniose Cutânea pode apresentar ramificações com características diferentes entre si, sendo classicamente as mais conhecidas a forma Cutânea Localizada, Cutânea Difusa e Mucocutânea [7]

A forma cutânea é a manifestação mais comumente encontrada em pacientes comprometidos pela doença, sendo caracterizada por lesões ulcerosas dormentes e localizadas em geral, no local da picada do inseto. A lesão é caracterizada pela sua moldura em formato arredondado ou ovalado com bordas elevadas e base avermelhada e o fundo contém forte teor granuloso. No entanto, geralmente a úlcera é indolor e somente por infecções de outros

microrganismos associados como bactérias, ocorre dor no local havendo a possibilidade de formação de exsudato seropurulento, que ao sofrer dessecação recobre o fundo da lesão. A lesão pode ser única ou apresentar-se de forma múltipla, distribuída próxima a região acometida pelo vetor, tendo como espécie crucial em tal manifestação a *Leishmania guyanensis*. Apesar das características citadas, existe a tendência de cura espontânea por parte do hospedeiro, além de apresentar respostas positivas quando tratada [7].

A forma disseminada é a condição menos conhecida da doença e que é proveniente de uma evolução do caso citado acima, na qual inicialmente as lesões apresentam-se próximas ao local acometido pelo vetor. Contudo as lesões distribuem-se por todo o corpo do hospedeiro, variando seu tamanho e formato, sendo tal ramificação oriunda da disseminação do parasita causada provavelmente, por via hemática ou linfática. Protagonizando a síndrome em questão temos as espécies *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis* [8].

Apesar dos casos já citados, a forma cutânea possui ainda uma ramificação mais rara, sendo conhecida como Leishmaniose Cutânea Difusa. Protagonizada pela *Leishmania amazonensis*, esta forma afeta pacientes com sistema imune comprometido, nos quais não há a formação de antígenos específicos ao combate do parasita. Por conta disto, a lesão que surge semelhante à forma cutânea padrão, possui alta resistência ao tratamento, apresentando uma resposta terapêutica insuficiente. Logo, a infecção alastra-se no corpo do hospedeiro, apresentando lesões formadas por placas e nodulações não ulcerosas [9].

A Leishmaniose Mucocutânea ocorre como uma evolução da forma cutânea da doença, atingindo uma fração de 3 a 5% dos acometidos pela forma padrão. Acredita-se que esta ramificação é oriunda da disseminação dos parasitas na forma linfática e hematogênica, como na forma difusa. No entanto, os tecidos afetados pelo parasita neste caso, são as mucosas, afetando principalmente regiões como as mucosas nasais, orofaringe, lábios e língua. Prosseguindo com sua evolução, a enfermidade pode atingir regiões internas do hospedeiro como a laringe e traqueia, além de mais raramente alcançar as conjuntivas oculares e as mucosas de órgãos genitais [10].

1.2.2 Diagnóstico

O diagnóstico desta enfermidade é subdividido geralmente em diferencial e laboratorial. O primeiro busca eliminar outras doenças que também acometem a pele e mucosas, como sífilis (em comparativo com a Leishmaniose Cutânea), Hanseníase (em

comparativo com a forma Cutânea Difusa) e granuloma (em comparativo com a forma mucosa) [11].

O segundo é feito através de exames parasitológicos, sendo comumente empregada a técnica de impressão por aposição para determinar a existência da forma amastigota do parasita. Complementando este modelo também são empregados os exames imunológicos, incluindo a intradermorreação de Montenegro e Imunofluorescência Indireta [11].

1.2.3 Tratamento

O composto antimonial ureastibamina foi o primeiro fármaco a ser utilizado no tratamento da Leishmaniose, datado de 1922 na Índia, onde apresentou forte atividade leishmanicida contra a *Leishmania donovani*. Por conta disso, a classe de compostos antimoniais recebeu forte atenção, ocorrendo anos depois o descobrimento e refino dos antimoniais pentavalentes, que ainda são os fármacos mais utilizados no combate a doença, tendo apenas suas fórmulas modificadas ao longo do tempo, visando reduzir os efeitos colaterais [12].

Porém, os antimoniais ainda apresentam fortes obstáculos em relação ao seu uso, como administração venosa e toxicidade elevada, além do alto custo do tratamento e lento período de recuperação [13]. Então, como segunda linha de ação contra a doença, costuma-se utilizar medicamentos como a pentamidina e anfotericina B em suas formas modificadas. Contudo o alto custo envolvido além de apresentarem fortes efeitos colaterais, como febre e problemas gastrointestinais, limitando o uso destes medicamentos [14].

Eliminando grande parte dos obstáculos recorrentes ao tratamento da doença, surge a Miltefosina (MT), sendo o primeiro fármaco apto a tratar as duas formas cutânea e mucosa da Leishmaniose, apresentando ainda via oral como administração, eliminando a necessidade de internação por parte do paciente [15]

1.2.4 Medidas Profiláticas

Por se tratar de uma doença transmitida por um vetor inseto, dentre as medidas de combate devem ser destacados o uso de mosquiteiros, telas de proteção em janelas e portas, aplicação de repelentes e uso de roupas longas para o caso de habitantes próximos a áreas de risco [6].

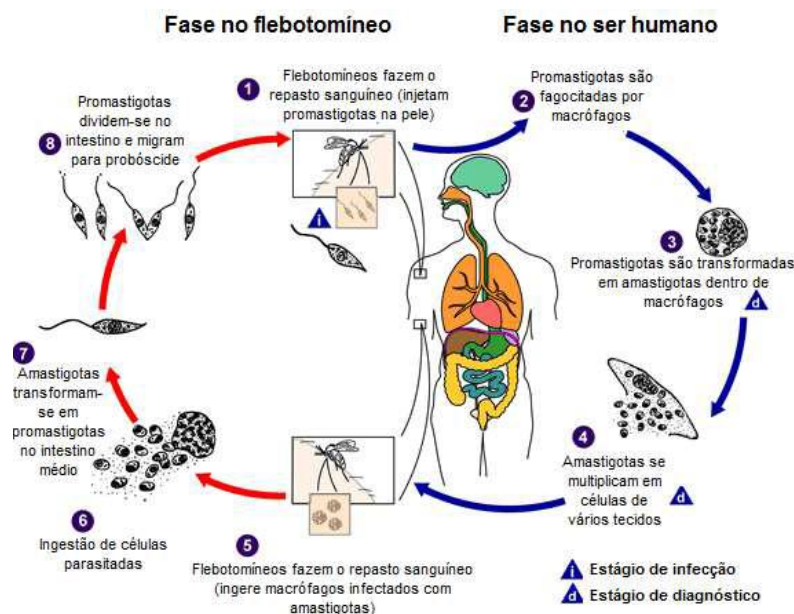


Figura 1. Ciclo biológico dos protozoários do gênero *Leishmania*. Adaptado de [105]

O controle dos possíveis reservatórios, como os animais domésticos também é indicado, realizando exames regularmente e vacinando os mesmos. Além disso, o tratamento de animais afetados pela doença deve ser feito seguindo estritamente todas as recomendações do médico veterinário [5].

O ambiente ao redor também deve ser constantemente vistoriado, buscando evitar o acúmulo de material orgânico e locais úmidos, bem como aplicação de inseticidas. Complementando, medidas socioeducativas também devem ser empregadas com o intuito de prevenir a transmissão e perpetuação da doença [5].

1.2.5 Transmissão

O ciclo da Leishmaniose é classificado como heteroxênico, alternando sua permanência entre hospedeiros vertebrados (reservatório) e invertebrados (vetor). Além disto, a depender do meio onde o parasita se encontra, o mesmo sofre modificações em sua morfologia, apresentando flagelo quando presente no trato digestório do vetor e sendo chamado de promastigota, e no caso de sua presença em hospedeiros mamíferos, a leishmania perde seu flagelo quando sofre fagocitose pelos macrófagos, apresentando morfologia arredondada e sendo então nomeada, como amastigota [16].

O fenômeno de transmissão do parasita é iniciado com a ação do vetor, que ao executar o repasto sanguíneo, ingere células infectadas pelas formas amastigotas. No interior do vetor então, devido à mudança de ambiente e substrato, as células sofrem degradação e

liberam as formas amastigotas, que se diferenciam em formas promastigotas procíclicas e sofrem múltiplos processos de divisão. Decorridos de 4 a 7 dias desde o início de sua reprodução, as formas promastigotas cessam a divisão, a esta altura já se apresentando na forma infecciosa do parasita, conhecida como promastigota metacíclica. Nesta forma os parasitas deslocam-se até as glândulas salivares do mosquito, onde após um novo repasto sanguíneo do vetor, adentram no tecido e na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado, infectando novamente as células fagocitárias e reiniciando seu processo de divisão celular, mas desta vez por repartição binária, até o momento em que consegue romper a célula infectada e cair mais uma vez na corrente sanguínea, infectando outras células e reiniciando o ciclo indefinidamente [16,17].

Independentemente da espécie de parasita envolvida, o ciclo será o mesmo, apresentando diferenças na evolução da infecção, fator este dependente da resposta imune do hospedeiro e da virulência da espécie de *Leishmania* infectante, os quais definirão diferentes formas clínicas da Leishmaniose [17].

1.3 Lutzomyia e Leishmania

O protozoário causador da enfermidade é do gênero *Leishmania*, tendo como principais agentes no Brasil, as espécies *Leishmania amazonensis* e *Leishmania guyanensis*, tendo habitat preferencial na região amazônica do país e a *Leishmania braziliensis*, esta presente em todas as regiões. A transmissão do parasita é realizada pela fêmea do flebotomíneo *Lutzomyia*, conhecida vulgarmente por mosquito palha, que ao estar infectada no momento do repasto sanguíneo, transmite aos mamíferos o protozoário causador da doença.

Como se pode observar no perfil do vetor, a estrutura bucal é curta e rígida, o que impede que no ato da hematofagia, o vetor alcance o sangue das veias. Então para obter o alimento, o *Lutzomyia* utiliza de suas estruturas bucais para dilacerar a pele do mamífero, formando uma poça de sangue com a qual o mesmo se alimenta, processo este conhecido como telmatofagia ou “poll-feeding” [18]. É interessante notar que, como já mencionado anteriormente, as leishmanias (amastigotas) encontram-se alojadas nos fagolisossomos dos macrófagos, encontrados no fígado e baço. Estes por sua vez, não se encontram acessíveis nos vasos sanguíneos, impossibilitando a infecção dos demais gêneros de mosquitos. No caso do vetor em questão, o ato de dilacerar a pele, o mesmo causa uma irritação, fazendo o sangue

jorrar dos capilares mais internos para o tecido lesionado, levando consigo os macrófagos infectados e/ou liberando as amastigotas. Tal fenômeno explica o porquê de somente os flebotomíneos serem os vetores da leishmaniose [18].

No interior do *Lutzomyia*, os macrófagos ingeridos se rompem e liberam a forma amastigota da leishmania, que devido à mudança de hospedeiros, a variação de temperatura, pH e nutrientes, faz com que a amastigota sofra uma diferenciação, desenvolvendo uma cauda e sendo conhecida como forma promastigota [19]. Vale ressaltar que, a forma promastigota, independentemente da espécie da leishmania, pode se diferenciar em cinco formas distintas, sendo estas: promastigotas procíclicas, nectonomas, paramastigotas, haptomas e metacíclicas. A Figura 1 mostra as morfologias.

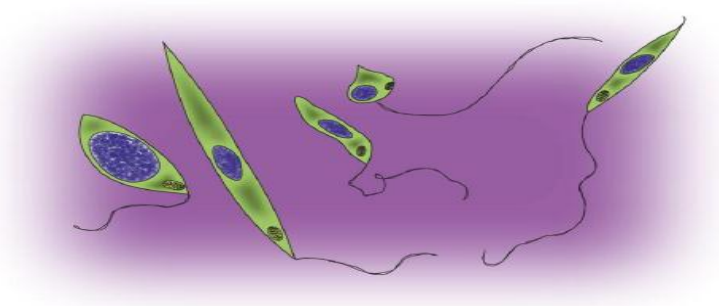


Figura 2: Morfologia das promastigotas encontradas no interior do vetor. Da esquerda para a direita: Procíclica, nectonoma, paramastigota, haptoma e metacíclica. Imagem extraída de [20].

Apesar de constatada a existência dos diferentes morfotipos apresentados acima, o conhecimento sobre como estas formas se originam e suas funções, além dos parâmetros determinantes para que ocorra o surgimento destas formas, está distante de ser completamente elucidado [20]. Tendo isto em mente, geralmente as formas mais abordadas são a forma promastigota procíclica (forma não virulenta) e a promastigota metacíclica, sendo esta última a responsável por adentrar no hospedeiro mamífero no ato da hematofagia.

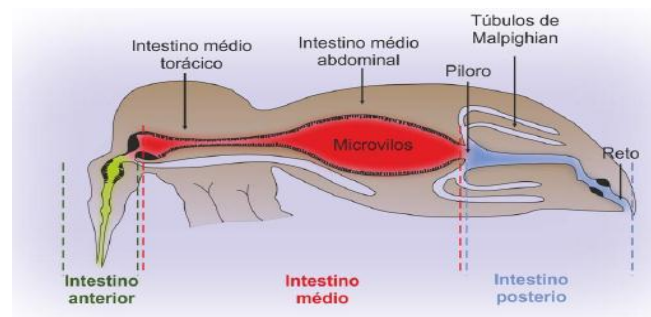


Figura 3: Esquema simplificado do sistema digestório do *Lutzomyia*. Figura extraída de Tópicos Avançados em Entomologia Molecular, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular INCT [20].

O processo de reprodução da leishmania no interior do vetor é iniciado quase que imediatamente após a hematofagia, visto que ao adentrar no sistema digestório do inseto, a forma amastigota se posiciona na porção central do bolo alimentar obtido, onde sofre a diferenciação em promastigota, além de haver também o surgimento da matriz peritrófica, uma região que envolve o bolo alimentar, composta essencialmente de proteínas, glicoproteínas e quitina, que auxilia no desenvolvimento e protege os parasitas em seu interior [21,22].

Durante as próximas 48 h então, em paralelo ao processo de digestão do vetor, ocorre à reprodução massiva das promastigotas procíclicas. Passados os dois dias, a digestão é finalizada; a matriz peritrófica é degenerada, liberando as promastigotas que mantêm o processo de reprodução ativa e o bolo fecal é formado. Decorrido algum tempo o bolo fecal começa a ser excretado, revelando então o principal intuito do surgimento dos flagelos nas promastigotas: tal mecanismo é utilizado pelas leishmanias para a fixação destas na parede do intestino do vetor, como uma forma de evitar sua eliminação por conta do processo de excreção do bolo fecal [23,24].

Finalizado o processo de excreção, as promastigotas transformam-se de procíclicas para metacíclicas (forma virulenta da leishmania), desacoplam-se da parede intestinal e migram para o intestino médio, onde mantêm sua reprodução durante os próximos cinco dias. Decorrido este tempo, o intestino do vetor estará completamente limpo, dado a total eliminação do bolo fecal. Com isso, o desenvolvimento dos ovos do mosquito e a oviposição estão completas, fazendo com que novamente o vetor tenha que praticar a hematofagia. A esta altura, as promastigotas metacíclicas já se encontram na porção anterior do intestino, preparadas para no ato da picada do inseto, infectarem o mamífero e recomeçar o ciclo da doença [25,26]. Finalizada a picada do *Lutzomyia*, as promastigotas são liberadas na corrente sanguínea, onde preferencialmente atacam as células de defesa, sendo os macrófagos os mais afetados.

1.4. Membrana Plasmática da leishmania.

Presente em todos os tipos de células conhecidas sejam procariontes ou eucariontes, as membranas plasmáticas possuem função essencial para a manutenção da sobrevivência das células. Atua essencialmente como uma barreira, que separa as organelas internas do meio exterior, além de manter seus constituintes internos em um ambiente favorável ao seu pleno

funcionamento. Também serve como uma espécie de “filtro” e em condições normais é seletiva, deixando permear somente os compostos essenciais à sobrevivência da célula [27].

Sua formação é gerada pela hidrofobia das moléculas lipídicas, visto que, quando duas moléculas de fosfolipídios estão em meio aquoso, as partes apolares representadas pelos ácidos graxos se juntam devido às interações hidrofóbicas, e a parte polar fica em contato com o meio aquoso [28].

Esta é a configuração base para a formação de uma membrana, visto que para haver a manutenção da vida da célula mais ingredientes são necessários à sua formulação. Neste contexto estão as proteínas denominadas transportadoras (ou carreadoras), que atuam como porta de entrada para determinados compostos essenciais à célula, atuando como uma espécie de filtro celular, dando a característica crucial das membranas: A seletividade. Posicionando-se entre a bicamada lipídica, tais proteínas podem ser vistas na Figura 3.

Além das proteínas transportadoras, há também as proteínas participantes do chamado glicocálix, uma matriz extracelular que envolve a membrana plasmática e é composta essencialmente por açúcar ligado aos fosfolipídios e proteínas desta membrana, formando respectivamente glicolipídios e glicoproteínas. A principal função das proteínas presentes neste substrato é a de reconhecimento intercelular e adesão entre outras células. Além disso, esta matriz também contribui para a proteção da membrana contra lesões químicas (no caso de haver alguma molécula que reagiria com os componentes da membrana, contribuindo para sua deformação) e mecânicas (no caso de choque entre células). Como função adicional o glicocálix, em células que têm a habilidade de locomoção, auxilia na redução do atrito entre a membrana e o meio extracelular, já que as moléculas de água se aderem ao açúcar e tornam a superfície celular mais lisa.

Já no ramo estrutural, duas proteínas fundamentais sendo estas a actina e a tubulina, compõem o citoesqueleto da célula, responsável por dar a forma com a qual a mesma se apresenta, mantendo e organizando seu conteúdo interno (organelas) e auxiliando nos processos de divisão celular. Também tem função essencial nos movimentos ameboides de cílios e flagelos de protozoários.

Complementando todo este modelo, temos ainda moléculas de colesterol, que aumentam o poder de defesa da membrana e devido a sua própria composição de anéis rígidos de esteroides, diminuem a fluidez da membrana [29].

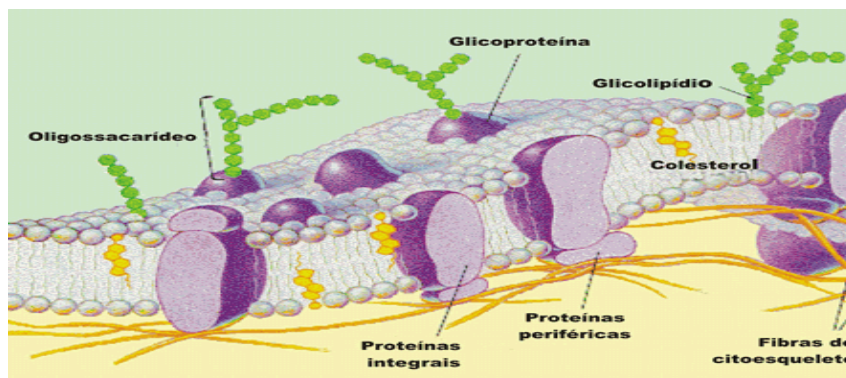


Figura 4: Esquema da membrana plasmática completa, contendo os oligossacarídeos, glicoproteínas, glicolípídios, colesterol, fibras do citoesqueleto e as proteínas periféricas e integrais. Imagem adaptada de [29].

Logo em sua composição, estão essencialmente fosfolípidios, proteínas e colesterol, caracterizando visualmente assim o modelo mais aceito para representar a membrana: O mosaico fluido, sugerido pelos pesquisadores Singer e Nicholson em 1972. O nome mosaico fluido é oriundo do próprio comportamento dos constituintes da membrana, visto que os fosfolípidios dão o aspecto mais rígido e básico da membrana, enquanto que algumas proteínas ficam presas entre estas conformações e outras podem se deslocar livremente, caracterizando assim uma espécie de mosaico biológico [27].

No caso das leishmanias, as membranas recobrem o parasita por completo, partindo da cabeça até o flagelo (promastigota). Isto deve ocorrer pois, como o parasita possui ciclo heteroxênico, alternando entre hospedeiros invertebrados e vertebrados, as variações de pH e temperatura podem causar danos permanentes ao parasita. Com isto, a membrana do mesmo é altamente complexa, apresentando diversos lipídios e proteínas para reforçar a resistência e a virulência do parasita [30].

Por conta disto, o glicálx da *Leishmania* em sua forma promastigota, é composto essencialmente por glicoconjugados, estruturas que apresentam carboidratos (polissacarídeos ou oligossacarídeos) ligados covalentemente a outras classes de moléculas, sendo geralmente proteínas e lipídios. Nesta composição especificamente, destacam-se as moléculas de glicofosfatidilinositol, que podem ser encontradas em sua forma livre conhecidas como glicoinositolfosfolípides (GIPLs) ou como âncoras (GPI), sendo estas últimas utilizadas para ligar moléculas da superfície celular à membrana do parasita, como proteínas e carboidratos. Dentre as proteínas, destacam-se as proteases, enzimas responsáveis por quebrar ligações peptídicas de aminoácidos das proteínas, valendo destacar a gp63, recorrente na superfície celular das promastigotas [31].

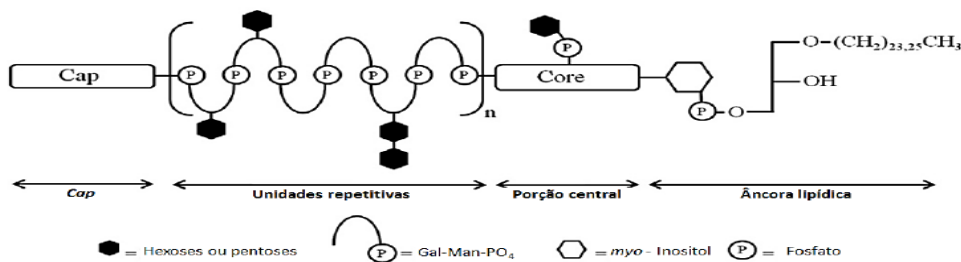


Figura 5: Esquema representativo do Lipofosfoglicano (LPG). Figura extraída e alterada de [32].

Além das já citadas, os parasitas ainda conseguem secretar os glicoconjugados nas formas de fosfatases ácidas (sAPs), fosfoglicanos (PGs) proteofosfoglicanos (PPGs). Mas dentre todos os glicoconjugados, o de maior importância é o Lipofosfoglicano (LPG), presente na superfície celular da *Leishmania* e recobrendo toda a forma promastigota, tal molécula é um heteropolímero formado essencialmente por quatro domínios [32,23].

Partindo da ilustração da Figura 4, a molécula é composta por uma âncora lipídica constituída por 1-*O*-alkil-2-lisofosfatidilinositol (PI), esta ligada a porção central representada pelo heptassacarídeo Gal(α 1-6)Gal(α 1-3)Gal(α 1-3)[Glc α 1-PO₄]Man(α 1-3)Man(α 1-4)-GlcN(α 1-). Vale ressaltar que as duas primeiras regiões são comuns a todas as variações de *Leishmanias*. A região central liga-se a uma unidade de dissacarídeos fosforilados Gal(α 1-4)Man(α 1-)-PO₄, que dão continuidade a região repetindo-se até chegar a extremidade, conhecida como Cap e representada por um oligossacarídeo neutro [33].

Essencial a *Leishmania*, o LPG tem papel fundamental na virulência e reprodução da mesma, ao passo em que auxilia na adesão do parasita ao intestino médio do vetor e aumenta a resistência a enzimas digestivas. No hospedeiro mamífero, o LPG tem função essencial na infecção dos macrófagos, atuando no reconhecimento das superfícies para o estabelecimento do parasita, função esta compartilhada com a proteína gp63 [33].

Além disso, o LPG também é tido como importante para o desenvolvimento e virulência da *leishmania*, ao passo em que sua estrutura sofre alterações na mudança da forma promastigota procíclica para a forma promastigota metacíclica, como pode ser visto na Figura 5.

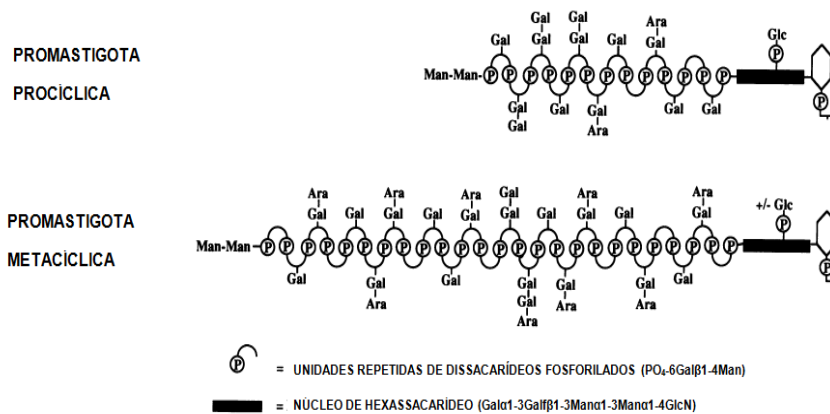


Figura 6: Esquema ilustrativo do LPG nas formas procíclicas e metacíclicas da *L. major*. Adaptado de [34].

Como pode ser observado, na forma metacíclica ocorre um aumento do número de dissacarídeos, além da substituição de alguns radicais de Galactose por Arabinose nas cadeias laterais da molécula. Esta variação nas dimensões da molécula, afetam a extremidade “Cap” constituída de 2 manoses ligadas entre si pela proteína Lectina. Com a alteração da cadeia, a Lectina tende a perder sua capacidade de ligação, causando o desprendimento da superfície das promastigotas das microvilosidades intestinais do vetor, resultando na migração dos parasitas para o intestino anterior [30,31].

O núcleo e a âncora lipídica, como citado anteriormente, permanecem inalterados durante a metaciclogênese do parasita.

1.5 Macrófagos

Os macrófagos são componentes essenciais para manter o pleno funcionamento do organismo humano, participando de uma espécie de “limpeza”, num processo conhecido como endocitose, onde acontece a ingestão pela célula responsável de partículas no meio, sendo tal processo subdividido em pinocitose (para partículas pequenas) e fagocitose (para moléculas maiores), eliminando células danificadas e envelhecidas, restos celulares e agentes estranhos.

Sua origem é proveniente da hematopoese, um processo de renovação do sangue recorrente no sistema hematopoiético, sendo este composto por medula óssea, saco vitelino e baço. A partir da diferenciação de monócitos (leucócitos) ocorre a formação de macrófagos, processo no qual os monócitos adentram na corrente sanguínea e são distribuídos ao longo dos mais diversos tecidos do corpo humano, onde finalizam a diferenciação em macrófagos.

Sabendo disso, vale ressaltar que dependendo da região do corpo humano onde macrófago é originado, o mesmo apresentará peculiaridades referentes ao tecido ou local no qual atua: as células responsáveis pela defesa dos pulmões recebem o nome de macrófagos

alveolares, enquanto que as Células de Kupffer atuam no fígado removendo células envelhecidas e destruindo bactérias. As células mesangiais no fígado praticam fagocitose de substâncias estranhas e as micróglia auxiliam na defesa do sistema nervoso. No tecido ósseo, os osteoclastos remodelam os ossos e no baço os macrófagos praticam a fagocitose de parasitas.

As dimensões de um macrófago variam de 25 μm a 50 μm de diâmetro, apresentando formato irregular. Suas organelas são geralmente comuns a do modelo de célula-padrão, contendo um núcleo de formato aproximadamente redondo, nucléolos, Complexo de Golgi e numerosa quantidade de ribossomos. Também são encontrados vacúolos citoplasmáticos próximos à superfície celular, recorrendo à atividade pinocitária que o macrófago possui. Além destas, os lisossomos também estão presentes e em alguns trechos da estrutura da célula, estão em processo de fusão com os vacúolos citoplasmáticos, intercalando com a função essencial do macrófago, ao passo em que tais organelas auxiliam na produção de enzimas hidrolíticas como as lipases e glicosilases e mais alguns tipos de enzimas que permitem a produção de reativos de oxigênio, aumentando então o poder antimicrobiano da célula. Além disso, os lisossomos também contribuem com um microambiente de pH ácido, auxiliando na digestão intracelular [35].

Já o citoesqueleto é constituído essencialmente de microfilamentos formados a partir de moléculas de actina, microtúbulos apresentando em sua estrutura a tubulina e os filamentos intermediários, os quais contêm em sua formulação proteínas como a queratina. Tal conjunto termina por dar um teor ondulado a membrana e auxiliam no desenvolvimento dos pseudópodes, estes essenciais para a locomoção do macrófago e à sua função fagocítica [35].

Essenciais para a realização das funções dos macrófagos encontram-se localizadas na membrana destas células, proteínas conhecidas como receptores de superfície. Tais moléculas são responsáveis pela interação da membrana do macrófago com a superfície do parasita, apresentando uma ampla variedade de PPR (pattern-recognition receptors), um grupo específico de proteínas responsáveis pelo reconhecimento de superfícies celulares. Desta família, vale destacar os receptores “Toll Like” (TLR), sendo estes os mais abundantes na estrutura da membrana celular. Podendo estar localizados tanto na superfície do macrófago quanto em regiões intracelulares, os TLR estão relacionados com a resposta imune e inflamatória, reconhecendo constituintes microbianos específicos derivados de vírus, bactérias, protozoários e fungos, estimulando a geração de sinais para a produção de proteínas e de citocinas inflamatórias [36].

Complementando o sistema de receptores, temos os receptores de manose (MR), “scavenger receptors” (SR) e os receptores de complemento. O primeiro atua como pilar para manter os níveis da glicoproteína que o nomeia, além de reconhecer patógenos e induzir à produção de antígenos. O segundo causa a formação da célula espumosa, macrófagos com elevada taxa de lipídios e no surgimento da aterogênese. Em se tratando de defesa, induz a produção do receptor MARCO (macrophage receptor with collagenous structure), responsável pela ligação a superfícies que contêm a lipoproteína LDL (Low Density Lipoprotein), recorrente em alguns microrganismos [37].

Os receptores de complemento atuam na otimização das funções de defesa, auxiliando na opsonização, processo em que ocorre a fixação de algumas proteínas (opsoninas) em antígenos específicos, facilitando o processo de fagocitose.

O processo de fagocitose é então iniciado, com a interação entre a membrana do patógeno com a superfície do macrófago. Nesta etapa a ligação entre as componentes das superfícies em questão, geram sinais que determinarão se a partícula deverá ou não ser ingerida. Se o PRR reconhecer o antígeno do patógeno, ocorrerá a elongação da membrana do macrófago (pseudópodes), que envolverão o alvo e o englobará numa espécie de vesícula, conhecida como fagossomo. Esta estrutura é então aderida à célula e funde-se com os lisossomos, iniciando o processo de digestão celular, onde ocorre a liberação de enzimas hidrolíticas que contribuem com a degradação da superfície microbiana e conseqüentemente morte do parasita [35].

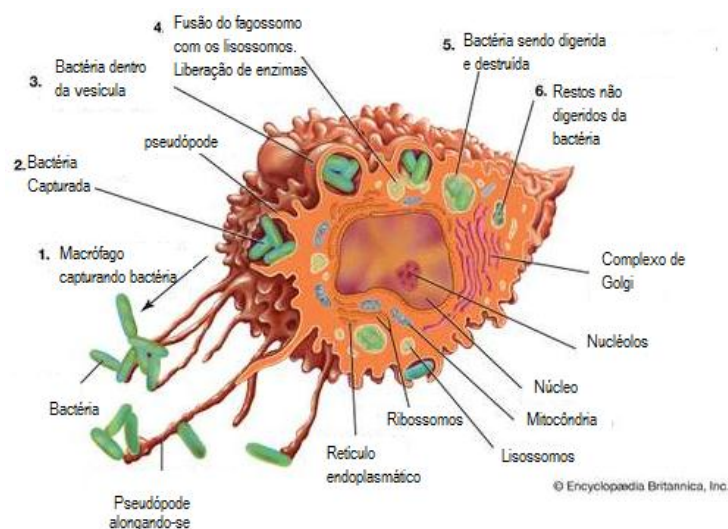


Figura 7: Processo fagocitose de uma bactéria por um macrófago. Os pseudópodes englobam e absorvem a bactéria no vacúolo, onde são liberadas enzimas para a destruição e eliminação. Retirado e alterado de [38].

1.5.1 Interação com leishmania-macrófagos

A infecção é iniciada logo após a hematofagia praticada pelo *Lutzomyia* onde as promastigotas metacíclicas são despejadas na corrente sanguínea do hospedeiro. Em pouco tempo ocorre a resposta imune natural do hospedeiro, apresentando o macrófago como principal fator de defesa. É nítido que o contato inicial entre macrófago e patógeno será dado por meio dos constituintes da membrana de ambas as células, sendo o sistema de complemento a primeira linha de defesa ativa no processo. No entanto, os açúcares presentes na estrutura da LPG presente na superfície da leishmania, conseguem evitar qualquer dano recorrente dos receptores de complemento, proporcionando a entrada da promastigota no macrófago de forma ílesa.

A próxima etapa da infecção envolve o reconhecimento das moléculas em superfície de ambas as células, estando presentes por parte do parasita, o LPG novamente e a GP63. Estas moléculas conseguem se ligar aos receptores presentes na estrutura do macrófago, especificamente os receptores de complemento CR1 e CR3, receptores de manose e receptores fibronectina. Durante a interação entre os receptores ocorrem os processos de opsonização e quimiotaxia (atração por ação de um gradiente químico), facilitando a fagocitose do parasita [39].

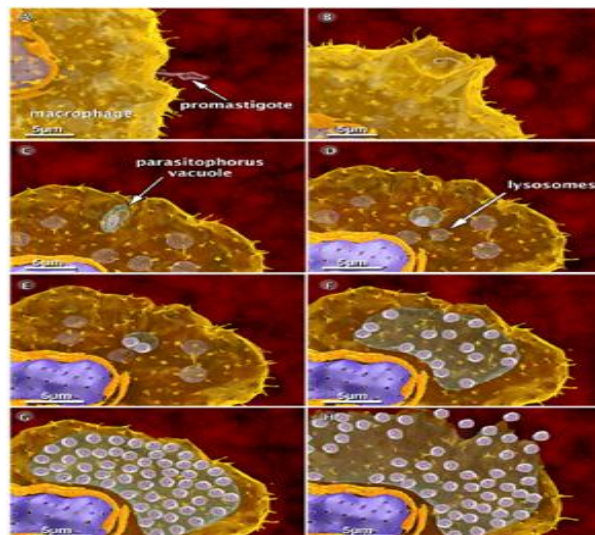


Figura 8: Fagocitose da Leishmaniose. Em A, temos o processo inicial de reconhecimento, B inicia-se ocorre a adesão do parasita via pseudópode, C o Vacúolo Parasitóforo é formado com o parasita em seu interior, D o parasita se funde aos lisossomos, E F G ocorre a massiva multiplicação do parasita, H ocorre a ruptura da membrana do macrófago devido à quantidade de amastigotas em seu interior. Retirado e Adaptado de [41].

Finalizada esta etapa, os pseudópodes envolvem a leishmania no vacúolo citoplasmático e ocorre a adesão do parasita à célula. Vale destacar que, devido à interação entre os receptores, o vacúolo tem sua estrutura alterada, sendo conhecida agora como vacúolo parasitóforo, onde a promastigota se adere à parede do mesmo e inicia sua diferenciação para amastigota. A esta altura, era de se esperar que o parasita começasse a ser destruído, no entanto a leishmania contém mecanismos em sua membrana que alteram as funções internas do macrófago, impedindo assim sua digestão pela célula. A proteína gp63 induz a produção de uma metaloproteinase que bloqueia o receptor SNARs, (N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor), responsável pela biogênese do fagolisossoma e interrompendo assim o processo de digestão celular [40].

Então finalmente é iniciado o processo de reprodução da amastigota, ocorrendo a bipartição das formas dentro do vacúolo parasitóforo, processo este repetido inúmeras vezes até a ocorrência da ruptura da membrana do macrófago, liberando os parasitas no meio extracelular. As amastigotas, portanto, terminam livres para infectarem novos macrófagos, dando continuidade ao ciclo da doença [40].

1.6 Sangue

Principal constituinte pela manutenção do sistema cardiovascular, o sangue é um fluido existente em todo o corpo humano, que o percorre se utilizando das veias, artérias e coração. Fazem parte desta mistura, o plasma e os glóbulos sanguíneos. O primeiro ocupa um volume que gira em torno de 53% a 58% do volume total da solução em questão. O soro é constituído essencialmente por água, chegando a 90% do total em média. O restante é subdividido em 7% de proteínas, sendo a mais conhecida e importante delas a albumina, responsável por manter a pressão osmótica do sangue. Um volume correspondendo a 0,9% do total é de sais inorgânicos e 2,1% divididos entre aminoácidos, hormônios, vitaminas e lipoproteínas.

Diluídos no soro, temos os glóbulos sanguíneos, um grupo de constituintes do sangue, sendo eles:

- Hemácias ou Eritrócitos: As hemácias são células de formato arredondado e com uma depressão no centro, o que aumenta sua superfície de contato para as trocas gasosas. Elas são originadas na medula óssea, sendo constituídas de ferro e hemoglobina, proteína de pigmentação vermelha e que tem como principal função a de transportar

oxigênio. No sangue, as hemácias compõem entre 42% a 47% do sangue integral. Por não terem núcleo, as hemácias são incapazes de se reproduzir, além de não conseguirem sintetizar proteínas e outras substâncias essenciais a sua manutenção. Por conta disso, elas têm vida curta, durando em média apenas 120 dias, sofrendo apoptose e sendo destruídas no fígado e baço pelos macrófagos, onde ocorre a quebra das moléculas de hemoglobina que serão reutilizadas na síntese de novas proteínas. O ferro restante deste processo é reaproveitado, retornando a medula óssea para a produção de novas hemácias [42].

- Leucócitos ou Glóbulos Brancos: São células de coloração branca e com núcleo. Têm como principal função a de sustentar a defesa do corpo contra microrganismos, praticando a fagocitose e a produção de anticorpos. Constituem cerca de 1% do volume total de sangue.
- Plaquetas ou Trombócitos: Em menor volume no sangue integral, mas com função estritamente necessária, as plaquetas são fragmentos originados dos megacariócitos, células presentes na medula óssea. Têm como única atuação o auxílio na coagulação sanguínea.

1.7 Surfactantes

Surfactantes ou tensoativos são compostos muito utilizados na indústria na fabricação de sabão, xampus e outros cosméticos. Recebem o nome de tensoativo, pois têm como função reduzir a tensão superficial entre uma ou mais superfícies. Sua composição estrutural é formada geralmente por uma cadeia de hidrocarbonetos, originando assim uma espécie de “cauda” apolar, e por uma ramificação normalmente cíclica, composta também de compostos orgânicos com um acréscimo de uma ou outra substância que desenvolva um caráter eletronegativo a molécula, sendo normalmente enxofre ou nitrogênio, constituindo por fim a “cabeça” polar.

Tal estrutura condiciona um caráter dual à molécula, sendo a parte composta pela cadeia carbônica a responsável por dar o caráter hidrofóbico da molécula. A região eletronegativa da molécula fica responsabilizada pelo caráter hidrofílico [43]

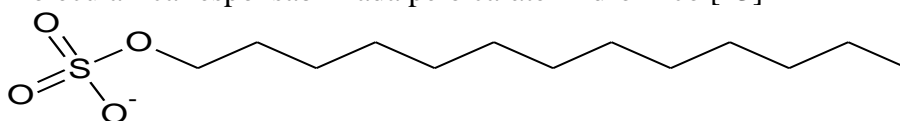


Figura 9. Surfactante Aniônico Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)

A parte polar da molécula, por conter átomos mais eletronegativos e que por consequência atraem elétrons, auxilia na solubilização em água, visto que o solvente em questão possui em sua estrutura tanto cargas negativas quanto positivas. Logo, independentemente da carga presente na parte polar o surfactante, esta será sempre a responsável por reagir com a água, enquanto que a região apolar e hidrofóbica (lipossolúvel) é encarregada de reagir com óleos e gorduras [44].

Partindo da premissa de que a parte polar deve conter cargas (íons) para haver a diluição em água, o simples fato de haver dois tipos de cargas sendo estas positivas ou negativas, caracterizam os surfactantes em catiônicos, caso a carga seja positiva, aniônicos no caso de serem negativas e em anfóteros em casos específicos de ocorrerem os dois tipos de cargas no mesmo composto.

A forma do SDS apresentada na figura 8 é comum a grande maioria dos surfactantes iônicos, onde na parte polar há um contra-íon agregado ao elemento eletronegativo. Ao entrar em contato com o solvente (água), o contra-íon sódio é dissociado, restando à parte polar dominada pelo oxigênio, deixando a molécula com carga negativa. O surfactante é tido então como aniônico, visto que a carga negativa é intrínseca a sua composição.

Outro fato interessante acerca da molécula em questão é que, o oxigênio é o elemento mais eletronegativo do Dodecil Sulfato de Sódio, logo sua afinidade por elétrons é maior, atraindo-os para a parte polar da molécula, aumentando ainda mais o poder eletronegativo desta região. Com isto, a “cabeça” desta molécula tende a atrair ainda mais elétrons e em solução aquosa, atrai facilmente os elétrons da água. Isto demonstra que surfactantes aniônicos tem alto grau de solubilização em água [44].

Analogamente ao caso dos surfactantes aniônicos, temos os surfactantes catiônicos:

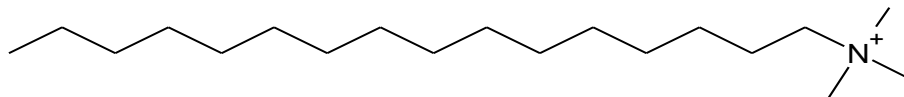


Figura 10. Surfactante Catiônico Cetil trimetil amônio (CTAC).

Semelhante ao caso anterior a molécula também tem em sua parte apolar, uma cadeia orgânica e em sua parte polar um elemento eletronegativo, no caso o nitrogênio. Mas diferentemente dos surfactantes aniônicos, o nitrogênio carrega a parte polar positivamente. Juntando isto ao fato de a parte polar sempre atrair elétrons de outras regiões, temos um efeito que atenua a solubilidade da molécula em água. Os elétrons atraídos da cadeia carbônica anulam a carga positiva do nitrogênio, reduzindo assim o poder eletronegativo da região

polar, fazendo com que esta atraia os elétrons e moléculas de água de maneira mais branda. Logo é nítido que, os surfactantes catiônicos naturalmente são menos solúveis em água que os aniônicos.

Além dos compostos iônicos já citados, também temos o surfactante zwitteriônico (anfótero), o qual o mesmo possui em sua estrutura tanto a carga negativo, caracterizando-o como aniônico, quanto à carga positiva moldando como catiônico.

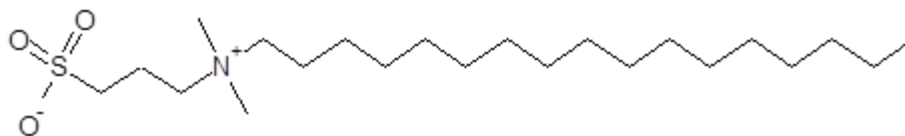


Figura 11. Representação estrutural do surfactante zwitteriônico n-hexadecil-N,N-dimetil-3-amônio-1-propanosulfonato (HPS).

Como observado na figura acima, o surfactante zwitteriônico contém em sua estrutura uma cadeia de carbonos em forma linear, moldando a “cauda” apolar e outra região na extremidade oposta de forma cíclica contendo dois elementos eletronegativos, sendo no caso o nitrogênio e o oxigênio. Percebe-se que o nitrogênio dá o caráter catiônico a molécula enquanto que o oxigênio o caráter aniônico, com isso moldando a “cabeça” polar. No fim das contas a carga total da molécula será nula e o seu comportamento em solução dependerá do pH onde mesma se encontra, sendo que em condições alcalinas (onde há maior concentração de íons OH), a carga negativa gerada pelo nitrogênio será anulada, restando apenas a carga negativa, fazendo com que a molécula em questão se comporte como um surfactante aniônico. Já em meio ácido ocorre o contrário: a alta concentração de íons H anula a carga gerada pelo oxigênio, deixando a tona somente o teor positivo, caracterizando a molécula como um surfactante catiônico [44].

1.8 Miltefosina

Descoberta na década de 80 e pertencente à classe das alquilfosfocolinas, a hexadecilfosfocolina como também é conhecida foi desenvolvida inicialmente para o tratamento de câncer [45]. No entanto, o medicamento é utilizado na Índia para o tratamento de Leishmaniose desde 2002, onde apresentou resposta positiva no tratamento de pacientes com leishmaniose refratária a outros medicamentos antimoniais [46]. Além destas enfermidades, o medicamento também é potencialmente efetivo contra o *Trypanosoma cruzi*

[47] e *Streptococcus pneumoniae* [48], apresentando também um amplo espectro de ação contra infecções fúngicas [49].

Possui fórmula molecular $C_{21}H_{46}NO_4P$ e peso de 407,57g/mol, e em sua estrutura contém uma longa cadeia carbônica, caracterizando a região apolar e hidrofóbica da molécula. O restante do fármaco é composto por uma região polar e hidrofílica constituída essencialmente por um grupo amino quaternário carregado positivamente e um grupo fosforil carregado negativamente, características estas que dão a Miltefosina um teor zwitteriônico.

Apesar de bastante utilizada, os mecanismo de ação da MT ainda não foram completamente elucidados. No entanto, algumas hipóteses são razoavelmente aceitas. Da estrutura molecular mostrada na figura 11, percebe-se que sua estrutura é semelhante a dos fosfolipídios presentes nas membranas biológicas. Com isto, a MT consegue interagir com as membranas dos parasitas, causando danos e afetando o metabolismo. A MT inicialmente acumula-se na Albumina e com o aumento da concentração e devido ao seu teor anfifílico, a MT forma micelas que se ligam às monocamadas lipídicas [91].

Logo a MT primeiramente interage com a membrana, alterando a fluidez e permeabilidade, moldando a composição lipídica e transdução do sinal proliferativo [93].

A sua estrutura química permite sua inserção na membrana sem degradação catabólica, podendo então adentrar na membrana e alcançar as membranas subcelulares, afetando o metabolismo da célula [93,94].

Ainda na membrana, sabe-se que a *Leishmania* apresenta alto teor de ésteres lipídicos, encontrados nos glicolipídios e glicoproteína da GPI. A MT interage com a enzima envolvida no metabolismo destes ésteres, cessando este processo. Além disso, as já citadas LPG e GP63 têm suas respectivas sínteses inibidas [95].

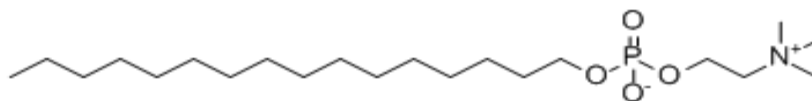


Figura 12. Estrutura Molecular do fármaco Miltefosina (MT).

A internalização do fármaco ocorre com o auxílio das proteínas de transporte LdMT e LdRos3, as quais formam um complexo de translocação na membrana, permitindo a passagem dos monômero da MT para dentro da célula [96].

Em altas concentrações do fármaco, A entrada da MT na célula da *Leishmania* pode ocorrer também via endocitose, devido à alta atividade endocítica da célula, onde os monômeros de MT ligados à membrana são absorvidos através das vesículas endocíticas. Já na parte interna

da membrana, os monômeros de MT se desprendem da parede celular e forma micelas dentro da célula. Contudo, pouco se sabe sobre a distribuição da MT nas organelas internas e sua distribuição intracelular [97].

No sistema de defesa, experimentos *in vitro* mostraram que a MT induz a ativação de macrófagos via estimulação das células T, onde tais células liberam citocinas, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio, citotóxicas à *Leishmania* [92]. Contudo, experimentos *in vivo* realizados com camundongos imunodeficientes, a MT apresentou eficaz atividade inibitória [98], demonstrando que seu mecanismo de ação não esteja relacionado majoritariamente com a resposta imune dependente da célula T ou por macrófagos ativados.

As limitações do uso da MT são relacionadas aos seus efeitos colaterais, majoritariamente problemas gastrointestinais como vômito e diarreia. Além disso, o tempo de meia vida do fármaco varia de 150 a 200h, ao qual pode favorecer a mutação de novos parasitas resistentes a este fármaco, visto que a dose remanescente no organismo após o tratamento é sub-terapêutica [100].

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar a ação dos surfactantes SDS, CTAC e HPS nas formas promastigotas da *L. (L.) amazonensis* (cepa Josefa), macrófagos *J774.A1* e sangue humano, afim de comparar com os efeitos da MT e assim analisar o mecanismo de ação do fármaco.

2.2 Objetivos específicos

- Usando o ensaio de MTT, determinar as concentrações dos compostos capazes de inibir o crescimento dos parasitos em 50% (IC₅₀).
- Determinar a viabilidade dos macrófagos pelo teste de MTT com o objetivo de encontrar as concentrações citotóxicas dos compostos que reduzem a população de células viáveis em 50% (CC₅₀).
- Medir as concentrações dos compostos capazes de induzir 50% de hemólise (HC₅₀) tanto em suspensão de eritrócito em PBS quanto no sangue integral.

- Avaliar os valores de IC₅₀, CC₅₀ e HC₅₀ para várias concentrações de células usadas nos ensaios a fim de determinar parâmetros biofísicos, conforme metodologia descrita na seção de Resultados. Estes parâmetros são: o coeficiente de partição membrana-água dos compostos, e as concentrações dos compostos em meio aquoso e na membrana celular para uma concentração na suspensão que corresponde ao IC₅₀.
- Estudar a interação dos surfactantes e MT com os lipídeos e proteínas das membranas plasmáticas da *Leishmania* e eritrócito, bem como seu comportamento em plasma sanguíneo, com a aplicação da técnica de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) e uso de marcadores de spin.
- Analisar os parâmetros biofísicos visando obter informações sobre os mecanismos de ação dos surfactantes e MT sobre os parasitas.

3. TÉCNICAS EXPERIMENTAIS

3.1. Espectrofotometria de absorção molecular no UV/Vis

É uma técnica utilizada para se avaliar a quantidade de luz que uma determinada molécula/amostra consegue absorver quando submetida à irradiação. Amplamente utilizada nas áreas de física, química e biologia, tal técnica data de mais de 50 anos, valendo destacar sua facilidade em diversas aplicações em análises quantitativas e qualitativas de moléculas orgânicas, inorgânicas e bioquímicas, bem como seu baixo custo de execução [50].

Ou seja, a Absorbância será proporcional à concentração e ao caminho percorrido pela luz dentro do material:

$$A = \epsilon CL, \tag{1}$$

ϵ : Absortividade molar

C: Concentração da substância

L: Distância percorrida pela luz no corpo.

Esta é a lei de Beer-Lambert, a qual relaciona a absorvância por uma molécula com a concentração da mesma, o caminho percorrido pela luz e uma constante de absorvidade molar característica do material, sendo esta última dada em unidades de M⁻¹cm⁻¹, resultando a

equação da Absorbância em um valor adimensional, além de indicar a quantidade que um determinado material consegue absorver de luz.

Pode-se ainda relacionar a Intensidade inicial e final da luz após sair da amostra, de modo que teremos um I_0 (intensidade inicial) sendo maior que I (intensidade final), determinando a transmitância do material:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (2)$$

Onde teremos um número decimal que expressará a percentagem de luz que sairá da amostra:

$$\%T = \frac{I}{I_0} \times 100 \quad (3)$$

A absorbância realizada relaciona-se com as intensidades, pelo inverso do logaritmo da transmitância:

$$A = -\log_{10} T = -\log_{10} \frac{I}{I_0} \quad (4)$$

Onde tal número indica a quantidade de luz foi absorvida pela amostra.

O espectrofotômetro UV/vis é o equipamento utilizado para a aplicação da técnica em questão, aproveitando-se de sua capacidade de separar os constituintes da luz emitida, ao passo com que é possível selecionar a faixa de comprimentos de onda a ser utilizada nas medições. Os intervalos variam de 180nm a 800nm, faixas provenientes respectivamente do ultravioleta e infravermelho.

Os constituintes do espectrofotômetro de absorção no UV/vis são essencialmente uma fonte de estável de radiação contínua (Luz), monocromadores responsáveis por selecionar os comprimentos de onda, porta amostra, anteparo para detecção da radiação e unidade de processamento e leitura.

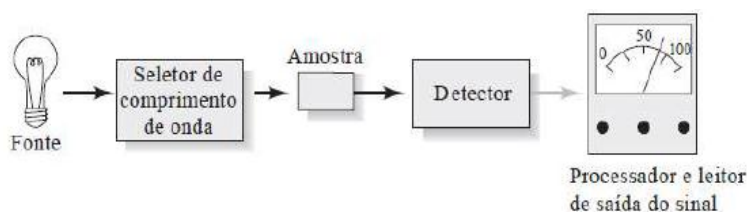


Figura 13. Esquema ilustrando os componentes básicos de um espectrofotômetro UV/vis. A fonte emite a radiação que pode ser alterada no seletor de comprimento de onda, seguindo para irradiar a amostra, onde é parcialmente absorvida e logo em seguida, chegando ao detector e processador, onde é medida a absorbância. Retirado de [51].

A fonte de luz emite a radiação que ao chegar ao monocromador, interage com a rede de difração do mesmo, que se utiliza de suas fendas para focar o feixe de luz em um

comprimento de onda específico, permitindo assim a seleção de comprimentos de onda. A amostra fica localizada em uma cubeta, conhecida comumente como célula, na qual é transparente para minimizar alterações nos resultados à luz visível. Na região ultravioleta, no entanto, a composição da célula passa a ser de quartzo ou sílica fundida. Ao transpassar a amostra, o feixe de luz transmitido atinge o detector, o qual por sua vez gera um sinal elétrico que é amplificado pela unidade de processamento de leitura [52].

Seguindo um aparato um pouco mais complexo, presente nos equipamentos mais modernos, para melhorar o sistema de análise emprega-se o projeto de feixes duplos, no qual a fonte de radiação tem sua luz dividida em dois feixes: o feixe de amostra e o feixe de referência. Todos os componentes do espectrofotômetro básico estão presentes, com a adição de um obturador que regula a saída de luz, um divisor de feixes, espelhos para a reflexão dos feixes, célula de referência e um fotodetector adicional para receptor o feixe da célula de referência [53].

Os equipamentos utilizados para a realização das medidas e obtenção dos dados necessários para a conclusão do trabalho utilizam-se da técnica de feixes duplos, sendo estes o PG instruments modelo T80+, localizado no laboratório de biofísica do Instituto de Física e uma leitora de Elisa Thermo LabSystems, modelo Multiskan, alocada no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), ambos pertencentes à Universidade Federal de Goiás (UFG).

3.2. Espectroscopia de Ressonância Paramagnética (RPE)

3.2.1. Introdução

Quando um campo magnético externo é aplicado a um determinado material, do ponto de vista microscópico, os elétrons que orbitam ao redor do núcleo, sofrem a ação de uma força magnética, perpendicular ao campo e a velocidade do elétron, que faz com que este, siga uma trajetória em espiral no sentido horário. No entanto, pela lei de Lenz, elétrons girando no sentido horário é uma situação análoga às cargas positivas girando no sentido anti-horário. Tal ocorrido gera um campo magnético devido ao dipolo magnético induzido do elétron, com direção oposta ao campo magnético externo. A soma entre estes campos resulta num campo magnético interno com intensidade menor que o campo magnético externo aplicado. Este

fenômeno é conhecido como diamagnetismo e é predominantemente a característica magnética apresentada nos materiais em geral.

No entanto, além do já conhecido dipolo magnético induzido, o elétron possui um dipolo magnético intrínseco bem determinado, chamado de spin. O valor deste momento magnético é chamado magnéton de Bohr e tem valor em unidades do SI:

$$\beta = 9,27 \times 10^{-24} \text{ A.m}^2$$

O spin do elétron é caracterizado de tal forma que, este se organiza sempre aos pares dentro dos orbitais, de modo que o momento magnético de um par de elétrons termina se anulando. Deste modo, átomos com poucos elétrons desemparelhados terminam por apresentar uma magnetização próxima de zero, caracterizando assim um material diamagnético.

Num material paramagnético, na ausência de campos externos, os momentos magnéticos do mesmo, encontram-se organizados de maneira aleatória. Após a aplicação de um campo externo, tais momentos tendem a organizar-se de maneira a diminuir a energia interna do sistema, como descrito pelo produto interno:

$$U = - \vec{\mu} \cdot \vec{B} \quad (5)$$

Onde μ é o momento magnético e B é o campo magnético.

Logo, uma situação de mínima energia seria dos dipolos magnéticos organizados paralelamente ao campo. Tal fato faz com que o campo gerado pelos dipolos, some-se ao campo externo aplicado, gerando assim um campo magnético dentro da amostra maior que o campo externo, descrevendo assim um evento de paramagnetismo, fenômeno inerente a materiais com elétrons desemparelhados.

Uma onda eletromagnética é composta por campo elétrico e um campo magnético oscilantes, perpendiculares entre si. Se esta onda incide em um material, ocorrerá a absorção da energia da mesma, seja integral ou parcial, fazendo com que as propriedades microscópicas do material venham sofrer alterações, como por exemplo, nos níveis de energia.

A técnica que monitora a absorção de energia pelos elétrons deste material é conhecida como espectroscopia. No entanto, geralmente nas técnicas de espectroscopia, a componente elétrica da onda é a responsável por causar a mudança nos níveis de energia, interagindo com os elétrons, ao passo que na espectroscopia por ressonância paramagnética (RPE), o campo magnético é o responsável por tais transições de energia, interagindo com o momento magnético do elétron, conhecido como spin. Nesta técnica, materiais paramagnéticos são expostos a um campo magnético estável e um campo de modulação, ocorrendo neste processo

a transferência de energia, excitando os elétrons do material e fazendo com que ocorram diversos processos de transição de energia, possibilitando o monitoramento dos elétrons desemparelhados e elementos de transição.

A RPE data de meados de 1945, executada pela primeira vez pelo físico Evgeniy Zavoisky na extinta União Soviética [54] sendo que, já no ano de 1954, surgiram os primeiros resultados desta técnica em aplicações nos sistemas biológicos, com os pesquisadores Pake, Townsendj e Commoner descrevendo uma dependência entre a atividade metabólica e a concentração de radicais livres em espécies biológicas [55]

Tal passo no ramo biológico possibilitou a aplicação de moléculas como cátions metálicos e nitróxidos às amostras, tendo estas, o papel de atuar como sondas que monitoram a dinâmica molecular do sistema (tal molécula também é chamada de marcador de spin) na qual é incorporada, fornecendo informações sobre o grau de mobilidade ou rigidez do sistema, polaridade do meio, torção da cadeia molecular, entre outros, utilizando uma quantidade de amostra relativamente baixa [56]. Além disso, pela redução dos radicais de nitróxido, é possível determinar a atividade metabólica do sistema em questão.

Como pode ser observado no diagrama de bloco do equipamento de RPE apresentado na Figura 13, o espectrômetro essencialmente é composto por três constituintes básicos, sendo estes a fonte de radiação, a amostra irradiada e um detector que mede a intensidade transmitida da radiação incidente. Com isto, o aparato experimental do espectrômetro de RPE consiste, no Klystron, que é responsável por produzir as micro ondas plano polarizadas, que são transferidas pela guia de onda oca e retangular para o atenuador que ajusta o nível de potência. Logo em seguida, estas são encaminhadas ao circulador, que as redirecionam para a cavidade, onde está localizada a amostra, passando pela íris, dispositivo que ajusta a quantidade de radiação refletida para fora da cavidade. Após incidir na amostra, a radiação é refletida para fora da cavidade, chegando no circulador e desta vez sendo direcionada para o diodo de detecção. A micro onda interfere em uma corrente que passa pelo diodo e assim a quantidade absorvida é avaliada para diferentes valores de campo magnético (instrumentalmente é mais conveniente variar o campo magnético ao invés da frequência de micro onda). As ondas que são refletidas após a passagem no detector são conduzidas pelo circulador a um absorvedor onde são completamente eliminadas.

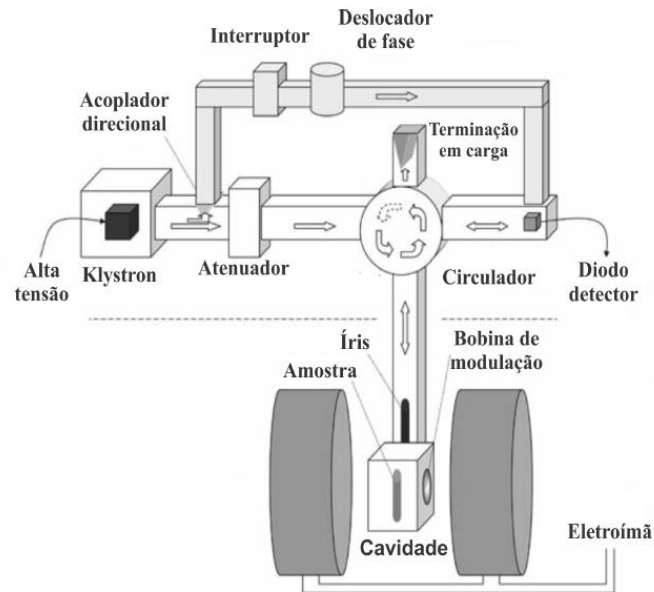


Figura 14. Representação esquemática de um espectrômetro de EPR de banda X. Adaptado de [57].

3.2.2 Conceitos básicos e Efeito Zeeman

O elétron apresenta dois tipos de momentos magnéticos, sendo um em torno do núcleo do átomo, conhecido como momento angular orbital (Representado geralmente por J) e um momento devido ao giro do elétron em torno do seu eixo, conhecido como Spin (representado pela letra S). A soma de ambos fornece o momento magnético total do elétron. No entanto, vale ressaltar que para a técnica de RPE, o momento de Spin tem uma contribuição quase que integral.

Um dipolo magnético do elétron apresenta energia de interação:

$$E = - \vec{\mu} \cdot \vec{B} \quad (6)$$

Onde E é a energia, μ o momento magnético e B o campo magnético externo aplicado. Tal energia pode ser derivada de uma Hamiltoniana na forma:

$$H = - \vec{\mu} \cdot \vec{B}$$

Considerando o campo magnético na direção do eixo z :

$$H = - \mu_z \cdot \vec{B}_0 \quad (7)$$

O momento magnético μ , como citado anteriormente, tem uma dependência quase que integral do spin, de modo que podemos expressar uma relação linear entre ambos:

$$\vec{\mu}_z = \gamma \vec{S}_z \quad (8)$$

Onde γ é a razão giromagnética, recebendo este nome por conta da sua origem, que é proveniente da razão entre o momento magnético e o momento angular. De forma geral, a mesma é dada por:

$$\gamma = \frac{gQ}{2m} \quad (9)$$

Com Q sendo a carga, m a massa da partícula e g o fator de Landé ($g = 2.00232$ para o elétron livre). Tal constante descreve a interação spin-órbita entre a molécula e o elétron desemparelhado. Para o elétron, temos que:

$$\gamma = \frac{-ge}{2m} \quad (10)$$

Onde e é a carga elementar do elétron e consideramos $Q = -e$. Agora aplicando (10) em (8):

$$\begin{aligned} \vec{\mu}_z &= \frac{-ge}{2m} \vec{S}_z \times \frac{\hbar}{\hbar} \\ \vec{\mu}_z &= \frac{-ge\hbar}{2m\hbar} \vec{S}_z \\ \vec{\mu}_z &= \frac{-g\beta}{\hbar} \vec{S}_z \end{aligned} \quad (11)$$

Com β sendo o magnéton de Bohr.

Ainda sobre o eixo z, consideremos o operador \vec{S}_z que possui dois autoestados, sendo estes $|\alpha\rangle$ e $|\beta\rangle$, onde o primeiro representa o spin do elétron para cima e o segundo, o spin do elétron para baixo. Aplicando o operador S_z sobre seus autoestados, temos que:

$$\begin{aligned} \vec{S}_z |\alpha\rangle &= \frac{\hbar}{2} |\alpha\rangle \\ \vec{S}_z |\beta\rangle &= -\frac{\hbar}{2} |\beta\rangle \end{aligned}$$

Podemos aplicar Eq. (10) na hamiltoniana em (6), de modo que obtemos:

$$H = \frac{g\beta B_0}{\hbar} \vec{S}_z$$

Aplicando esta hamiltoniana nos autoestados de S_z , temos que:

$$\begin{aligned} H|\alpha\rangle &= \frac{g\beta B_0}{2} |\alpha\rangle \\ H|\beta\rangle &= \frac{-g\beta B_0}{2} |\beta\rangle \end{aligned}$$

De modo que a energia pode assumir somente os valores:

$$E = \pm g\beta B_0/2 \quad (12)$$

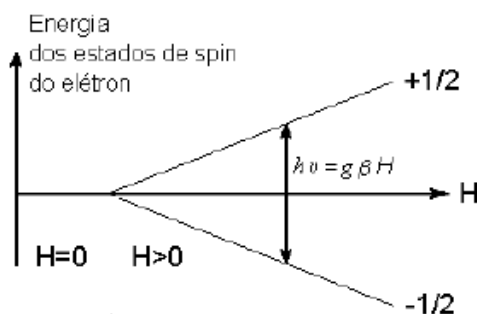


Figura 15. Níveis de energia Zeeman em função da intensidade do campo magnético. Em $H>0$, ocorre a quebra da degenerescência, resultando em dois estados associados a $M_s = +1/2$ e $M_s = -1/2$.

Onde a energia negativa é descrita para o estado de menor energia, enquanto que a positiva para o estado com maior energia. Vale notar que esta energia E depende do campo magnético externo e que a diferença entre estes valores de energia, resulta na energia de separação entre estes estados. A dependência de E por B , revela que antes da aplicação de um campo, os autovalores de energia da amostra paramagnética são degenerados. Quando a amostra é irradiada por micro-ondas de frequência fixa, para valores bem definidos de energia, os fótons do feixe eletromagnético serão absorvidos pela amostra, fazendo com que o auto estado $|\beta\rangle$, absorva um fóton com energia $h\nu = g\beta B_0$, de modo que o mesmo migre para o estado $|\alpha\rangle$. Paralelamente, o inverso também ocorre, onde o auto estado $|\alpha\rangle$ pode perder um fóton $h\nu$ de forma irradiada, retornando ao estado $|\beta\rangle$. Este processo é conhecido como efeito Zeeman e é responsável por eliminar a degenerescência do sistema, com a energia E oriunda deste efeito, sendo chamada Energia de Zeeman.

Além do spin do elétron estar no estado de mais baixa energia, a componente magnética do campo oscilante do feixe eletromagnético deve ser polarizada perpendicularmente a componente do campo externo, para que seja possível a absorção da energia $h\nu$, justificando a presença do polarizador no aparelho de RPE. Este campo precisa ter frequência igual a do spin do elétron em torno do eixo z , fazendo com que o sistema entre em ressonância com o campo oscilante, ocorrendo assim, as trocas de energia entre os estados, possibilitando a leitura no equipamento de RPE.

Somado a estas condições, por fim, temos a distribuição de Boltzman:

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = \exp \left[\frac{-\Delta E}{kT} \right] \quad (13)$$

Onde N_α e N_β são os números de Spins do auto estado de maior e menor energia respectivamente; E_α e E_β as energias destes estados, k a constante de Boltzman e T a temperatura absoluta do sistema. Aplicando (11) em (12), temos que:

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = \exp \left[\frac{-g_e \beta_e B_0}{kT} \right] \quad (14)$$

Expandindo numa série de Taylor em primeira ordem, obtemos:

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = 1 - \left[\frac{-g_e \beta_e B_0}{kT} \right] \quad (15)$$

Sendo possível notar que, no equilíbrio térmico, o auto estado de menor energia é levemente mais populoso que o estado de maior energia, concluindo assim todas as condições necessárias para a execução do efeito Zeeman. Caso N_α e N_β fossem iguais, não haveria o fenômeno de ressonância, visto que o número de spins excitados seria igual ao de spins de emissão induzida, não apresentando qualquer absorção ou emissão de energia, anulando qualquer sinal de ressonância para a leitura do espectro [58].

3.2.3 Processos de relaxação

Partindo da equação de Boltzman, é possível determinar que o estado $|\beta\rangle$ é levemente maior em população de spins que o estado $|\alpha\rangle$. Com a aplicação do campo externo, este absorve um fóton de energia, sofrendo uma transição para o estado de maior energia. Neste estado, não é possível ocorrer mais nenhuma absorção, visto que este já é o estado de maior energia. Tal processo continua até que as populações de estados $|\alpha\rangle$ e $|\beta\rangle$ se igualem, cessando o efeito Zeeman momentaneamente e saturando o fenômeno de ressonância, de modo que o sinal do espectro desaparece. No entanto, a interação do spin do elétron com a vizinhança, somado ao movimento aleatório dos átomos, retoma a troca de energia no interior deste sistema, aumentando novamente o número de spins com menor energia e possibilitando o reinício do Efeito Zeeman. Tal processo é chamado de relaxamento e se dá duas maneiras: Relaxamento Spin-Rede (longitudinal) e Relaxamento Spin-Spin (transversal) [59].

O relaxamento longitudinal acontece quando o spin de maior energia cede energia à átomos vizinhos (rede) na forma de calor, retornando ao estado $|\beta\rangle$. O tempo de vida médio do spin de maior energia é comumente chamado tempo de relaxação spin-rede (T_1), o qual descreve um decaimento exponencial de primeira ordem, que depende diretamente de fatores como a razão giromagnética do elétron, frequências rotacional e vibracional da rede. Além

disso, uma mobilidade maior na rede favorece transições de energia entre os auto estados, aumentando a quantidade de processos de relaxamento das populações de spin, reduzindo o valor de T_1 [60].

Considerando o princípio da incerteza de Heisenberg, podemos relacionar T_1 com a energia do sistema e obter:

$$\Delta E \cdot T_1 \sim \hbar, \quad (16)$$

Onde ΔE é a incerteza da energia, T_1 o tempo de relaxamento e \hbar a constante de Planck. Lembrando que $E=h\nu$, temos que:

$$\begin{aligned} h \Delta \nu \cdot T_1 &\sim \hbar \\ \Delta \nu &\sim \frac{1}{T_1} \end{aligned} \quad (17)$$

Com $\Delta \nu$ sendo a incerteza da frequência. Tomando a equação Eq. (11), e explicitando em termos de fóton:

$$\hbar \cdot \Delta \nu = g\beta e \Delta B \quad (18)$$

de onde tiramos o valor da incerteza da frequência e aplicamos em Eq. (16):

$$\Delta B \sim \hbar \cdot \frac{\Delta \nu}{g\beta e T_1} \quad (19)$$

Onde ΔB é a variação do campo magnético externo e representa as linhas de ressonância do espectro. Para um tempo T_1 muito curto, é possível notar que ocorrerá um aumento na largura das linhas de ressonância, de modo estas linhas se tornarão tão largas que não será possível observar as transições de RPE. Para T_1 muito longo, ΔB tende a zero, significando que o sistema passará do estado $|\beta\rangle$ para o estado $|\alpha\rangle$, não ocorrendo o inverso, saturando o processo e extinguindo o efeito Zeeman [60].

Por conta da distribuição aleatória de sua direção variar exponencialmente no tempo, a orientação relativa do Spin contribui para o relaxamento via Spin-Spin (ou transversal), não reduzindo a saturação, mas contribuindo para o alargamento da linha.

$$\Delta \nu \sim \frac{1}{T_2} \quad (20)$$

Onde T_2 é a constante de tempo de relaxação Spin-Spin. Quanto menor for o valor de T_2 , maior será o alargamento da linha e vice versa. Como ν representa a frequência de precessão, esta depende da intensidade e distribuição dos campos locais em torno dos centros paramagnéticos, pois a largura de linha depende dos movimentos de precessão dos spins em torno do campo magnético [61].

3.2.4 Fator de Landé

O fator g (ou fator de Landé) é uma constante característica do elétron livre, na qual descreve sobre a interação spin-órbita da molécula ao qual o elétron desemparelhado está interagindo. Por conta das transições de energia, os elétrons transitam pela estrutura molecular, produzindo um campo magnético local, ao qual pode se somar ou subtrair com o campo externo, variando o valor de g , que é descrito na forma:

$$g = \frac{h\nu}{\beta H} \quad (21)$$

Onde H_r é o campo magnético ressonante, β é o magnéton de Bohr e g é o fator de Landé ($g = 2.0023$ para o elétron livre).

Os desvios dos valores de g são essencialmente produzidos por um momento magnético orbital, introduzido por uma mistura de estados excitados no nível fundamental. Além disso, a magnitude do campo local pode ou não depender da orientação do campo externo, sendo chamado isotrópico, quando independe da orientação da estrutura molecular em relação ao campo e anisotrópico (o que mais ocorre), quando o inverso acontece, fazendo o fator g variar de acordo com a direção do campo externo.

Sabendo disto, o fator g pode ser descrito como um tensor de segunda ordem, em coordenadas cartesianas e escrito na forma:

$$\mathbf{g} = \begin{bmatrix} g_{xx} & g_{xy} & g_{xz} \\ g_{yx} & g_{yy} & g_{yz} \\ g_{zx} & g_{zy} & g_{zz} \end{bmatrix}$$

Onde, para um radical isotrópico, $g_{xx}=g_{yy}=g_{zz}$. A outra configuração possível é a da simetria axial, onde $g_{xx}=g_{yy} \neq g_{zz}$, onde os eixos x e y são equivalentes e o eixo z é anisotrópico. Neste caso, o fator g dos eixos x e y é conhecido como g_{\perp} e o g_{zz} como g_{\parallel} e vice versa. Na última configuração, onde todos os fatores g são diferentes, temos um sistema totalmente anisotrópico, onde $g_{xx} \neq g_{yy} \neq g_{zz}$.

3. 2.5. Interação Nuclear Hiperfina

A interação nuclear hiperfina ocorre quando o elétron desemparelhado interage com o momento magnético do núcleo, resultando no desdobramento das linhas espectrais. Tal interação é dada pela soma vetorial dos campos local e externo, resultando no campo efetivo, na forma:

$$H_{\text{eff}} = H_{\text{ext}} + H_{\text{local}} \quad (22)$$

Neste contexto, devemos levar em consideração o número quântico l , com este variando de 0, $\frac{1}{2}$, 1..., onde para o spin nuclear M_I , temos $(2l+1)$ valores possíveis para o H_{local} . Desta forma, a ressonância será observada em valores de $(2l+1)$ e o espectro será separado em $(2l+1)$ linhas, por consequência das regras de seleção $\Delta M_S = \pm 1$ e $\Delta M_I = 0$. Logo, a separação das linhas desdobradas é um fenômeno conhecido como desdobramento hiperfino.

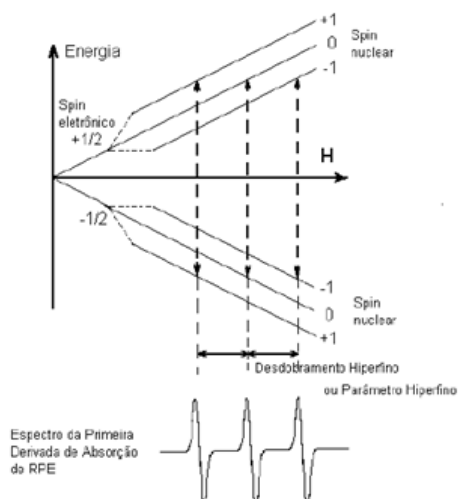


Figura 16. Níveis de Energia do Elétron desemparelhado interagindo com o Spin nuclear do Nitrogênio do grupo nitróxido (estrutura hiperfina) numa região de campo magnético no eixo z. Abaixo, a primeira derivada do espectro de absorção.

Tal fenômeno decorre da contribuição do elétron dos orbitais, p, d, f... Nesta configuração, o elétron está próximo ao núcleo, onde o momento de dipolo magnético do elétron ($\mu_e = g\gamma_e S$) e o momento magnético do núcleo ($\mu_n = g\beta I$), estão separados por uma distância r .

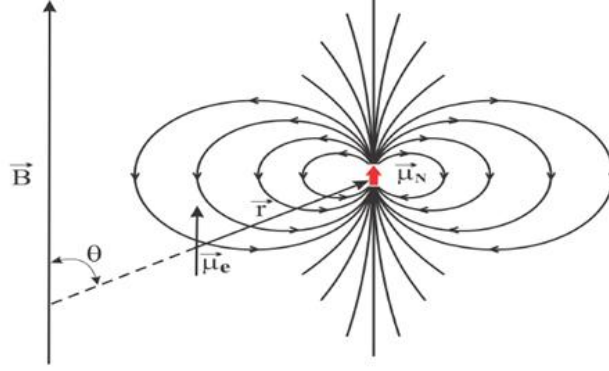


Figura 17. Interação entre os momentos de dipolo do elétron e núcleo μ_e é indicado pelo estado $m_s = -1/2$ e o vetor μ_N é indicado pelo estado $I = +1/2$. O ângulo θ é formado entre o vetor r que liga os dipolos e o campo magnético aplicado B .

Do exposto na figura acima, percebe-se que núcleo gera um campo local que se comporta como um dipolo magnético puntiforme. Além disso, há uma dependência do ângulo que é formado entre a linha que liga os dipolos e o campo externo aplicado. Com isto, conclui-se que esta interação dipolo-dipolo é anisotrópica, pois depende da orientação do H_{local} . O núcleo gera um campo local que se comporta como um dipolo magnético puntiforme [62]. A Hamiltoniana deste sistema é descrita por:

$$\hat{H}_D = -g_e\beta_e g_N\beta_N \left[\frac{\hat{S}\cdot\hat{I}}{r^3} - \frac{3(\hat{S}\cdot\vec{r})(\hat{I}\cdot\vec{r})}{r^5} \right] \quad (23)$$

Onde g e β são o fator de Landé e o magnéton de Bohr respectivamente, r é a distância entre os dipolos, S é o operador momento de Spin e I o operador momento nuclear. A quantidade r pode ser expandida em termos cartesianos, resultando na forma:

$$\hat{H}_D = \hat{I}\cdot g_e\beta_e g_N\beta_N \begin{bmatrix} \left\langle \frac{3x^2-r^2}{r^5} \right\rangle & \left\langle \frac{3xy}{r^5} \right\rangle & \left\langle \frac{3xz}{r^5} \right\rangle \\ \left\langle \frac{3xy}{r^5} \right\rangle & \left\langle \frac{3y^2-r^2}{r^5} \right\rangle & \left\langle \frac{3yz}{r^5} \right\rangle \\ \left\langle \frac{3xz}{r^5} \right\rangle & \left\langle \frac{3yz}{r^5} \right\rangle & \left\langle \frac{3z^2-r^2}{r^5} \right\rangle \end{bmatrix} \cdot \hat{S},$$

$$\hat{H}_D = \hat{I}\cdot \overleftrightarrow{T} \cdot \hat{S}. \quad (24)$$

Com cada elemento da matriz, representando a média da função de onda do elétron desemparelhado. T é o tensor de segunda ordem dado por:

$$\overleftrightarrow{T} = g_e\beta_e g_N\beta_N \begin{bmatrix} \left\langle \frac{3x^2-r^2}{r^5} \right\rangle & \left\langle \frac{3xy}{r^5} \right\rangle & \left\langle \frac{3xz}{r^5} \right\rangle \\ \left\langle \frac{3xy}{r^5} \right\rangle & \left\langle \frac{3y^2-r^2}{r^5} \right\rangle & \left\langle \frac{3yz}{r^5} \right\rangle \\ \left\langle \frac{3xz}{r^5} \right\rangle & \left\langle \frac{3yz}{r^5} \right\rangle & \left\langle \frac{3z^2-r^2}{r^5} \right\rangle \end{bmatrix}$$

Na diagonal:

$$T_{ii} = g_e\beta_e g_N\beta_N \left\langle \frac{3i^2 - r^2}{r^5} \right\rangle$$

(25)

Nas demais colunas:

$$T_{ij} = g_e \beta_e g_N \beta_N \left\langle \frac{3i_j}{r^5} \right\rangle \quad (26)$$

A segunda contribuição para a interação hiperfina ocorre quando o elétron desemparelhado encontra-se no orbital s. Por conta de sua simetria esférica, este orbital faz com que a interação dipolo-dipolo tenha média nula. Entretanto, o elétron deste orbital ainda pode interagir com o núcleo. Para quantificar esta interação, utiliza-se a interação de Fermi, a qual é caracterizada por ser isotrópica. Tal Hamiltoniana é escrita na forma:

$$\begin{aligned} \hat{\mathcal{H}}_{iso} &= \frac{8\pi}{3} g_e \beta_e g_N \beta_N |\psi(0)|^2 \hat{I} \cdot \hat{S} \\ \hat{\mathcal{H}}_{iso} &= a \hat{I} \cdot \hat{S} \end{aligned}$$

Onde a é a constante de desdobramento hiperfino e $|\psi(0)|^2$ é a probabilidade de encontrar o elétron na posição do núcleo. Desta forma, podemos escrever o hamiltoniano da interação hiperfina de forma geral, englobando as interações de todos os orbitais:

$$\hat{\mathcal{H}}_{iso} = \hat{I} \cdot \overleftrightarrow{\vec{T}} \cdot \hat{S} + a \hat{I} \cdot \hat{S} = \hat{I} \cdot \overleftrightarrow{\vec{A}} \cdot \hat{S}, \quad (28)$$

Com o tensor $\overleftrightarrow{\vec{A}} = (\overleftrightarrow{\vec{T}} + a)$ sendo definido como o tensor hiperfino.

3. 2.6 O método do marcador de Spin

Historicamente, o uso do método de marcador de spin tem seu nascimento em 1965, utilizado pelos pesquisadores Onishi e McConnell [63].

Materiais biológicos são classificados como diamagnéticos, ou seja, não possuem elétrons desemparelhados, impossibilitando a aplicação da RPE. Para adaptar estas amostras ao espectrômetro, os pesquisadores Onishi e McConnell em 1965, criaram os marcadores de Spin (Spin Label). Tal molécula é constituída de um radical livre, que se liga a sítios específicos da molécula, fornecendo a esta, o caráter paramagnético necessário para a aplicação da técnica de RPE, possibilitando a obtenção de dados sobre o local ao qual o marcador encontra-se localizado no momento, como polaridade, dinâmica e orientação

molecular, anisotropia do movimento molecular, entre outros. Vale ressaltar que o marcador não reage com a amostra, apenas sendo incorporado em suas extremidades a ela [64].

O marcador de spin pode ser qualquer espécie paramagnética, mas em biofísica, os derivados de nitróxido são os mais utilizados, pois em meio biológico, apresentam estabilidade para diferentes valores de pH, bem como concentração de sais, variação de temperatura, etc [64].

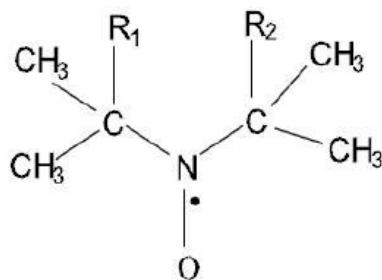


Figura 18. Fórmula estrutural geral do marcador de spin com radical nitróxido. R₁ e R₂ representam grupos químicos que variam de acordo com o marcador.

Como pode ser visto na figura acima, o marcador fornece o elétron desemparelhado. Além disso, os grupos metila vizinhos do átomo de nitrogênio, estabilizam o elétron desemparelhado, impedindo que este circule pelo anel piperidínico. Ademais, os marcadores nitróxidos são solúveis em meios polares e apolares, onde em meio polar, o oxigênio forma ligações de Hidrogênio e em meios apolares, os grupos metila reagem, diluindo o marcador. Os grupos R₁ e R₂ são radicais que variam de acordo com o marcador, onde estes são os responsáveis pela incorporação do marcador à amostra. No trabalho em questão, um dos marcadores utilizados foi o 5-doxil estearato (5-Doxyl Stearic Acid), também conhecido como 5-DSA. Neste marcador, os radicais R ligam-se às regiões lipídicas. O outro marcador foi o Maleimido (6-MSL), o qual se intercala nas regiões de grupos específicos de proteínas [64].

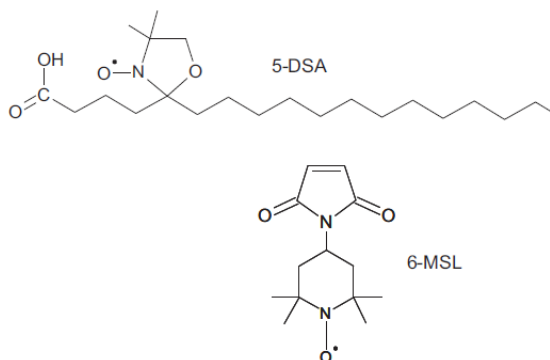


Figura 19. Marcador lipídico 5-DSA e Marcador proteico 6-MSL.

O átomo de Nitrogênio possui número quântico magnético $I=1$, fazendo com que seu spin nuclear apresente três orientações possíveis, pois $m_I = -1, 0, +1$. Com isto, por conta do fenômeno de desdobramento hiperfino, o espectro fornece em solução, um triplete com intensidades próximas e iguais distâncias entre as linhas.

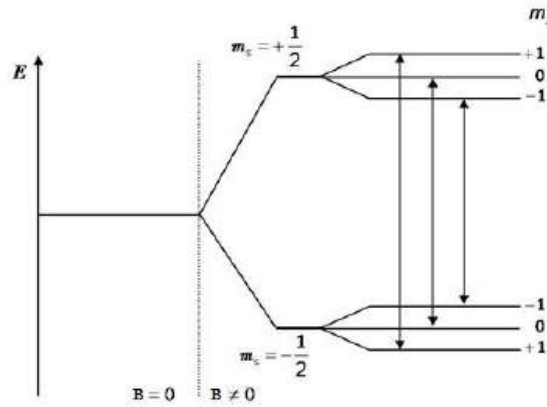


Figura 20. Níveis de energia do elétron desemparelhado do grupo nitróxido na presença de um campo magnético aplicado. O desdobramento dos níveis ocorre pela interação entre o momento magnético eletrônico e nuclear do átomo do Nitrogênio.

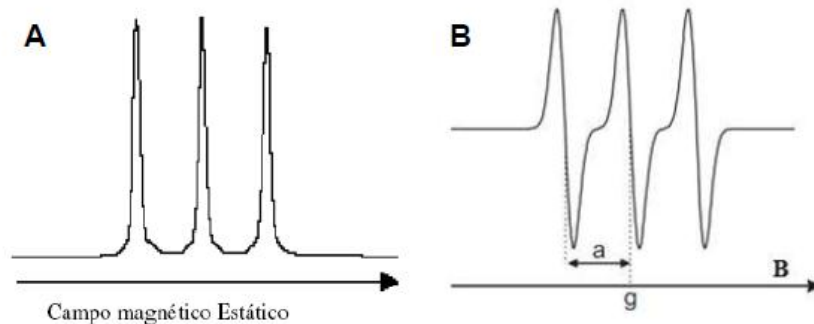


Figura 21. Espectro de absorção do radical nitróxido; (B) Primeira derivada da curva de absorção. g define a posição da linha central e a define a constante de desdobramento hiperfino.

A distância entre duas linhas adjacentes do espectro é igual ao valor da constante de desdobramento hiperfino a , medida em Gauss (G), enquanto que o fator g define a posição da linha central em relação ao campo magnético aplicado. Os valores de ambos são descritos a seguir:

$$a = \frac{1}{3}(A_{xx} + A_{yy} + A_{zz})$$

$$g = \frac{1}{3}(g_{xx} + g_{yy} + g_{zz})$$

Devendo ressaltar que o valor de a , pode variar a depender do meio onde o radical nitróxido está inserido. Um exemplo disto ocorre quando o marcador está em meio aquoso. O oxigênio do nitróxido forma ligações com o hidrogênio da água, onde o hidrogênio fornece

uma carga positiva, gerando um campo local que polariza a densidade eletrônica de ligação entre o nitrogênio e o oxigênio. Com isto, o nitrogênio fica eletropositivo, atraindo para si o elétron desemparelhado e por consequência aumentando a interação hiperfina isotrópica (interação de Fermi), pois o elétron está fracamente ligado ao núcleo. Desta forma, o valor da constante de desdobramento hiperfino, aumenta com o valor da constante dielétrica do solvente, fornecendo informações a respeito da polaridade do meio [64].

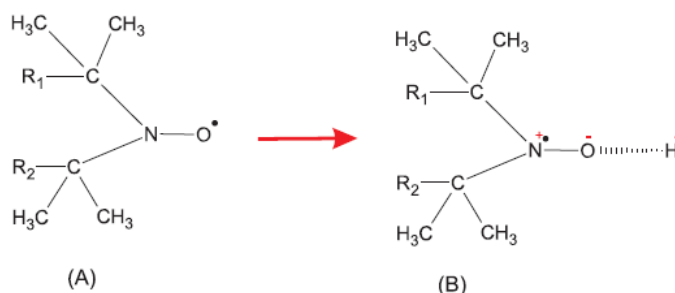


Figura 22. Esquema do oxigênio do radical nitróxido realizando ligação de hidrogênio, polarizando a ligação N–O e fazendo com que o elétron se localize mais próximo do núcleo do átomo de nitrogênio, aumentando a contribuição do acomplamento hiperfino

3. 2.6 Anisotropia Espectral

Do visto até o momento, podemos concluir que as componentes principais do fator g (g_{xx} , g_{yy} , g_{zz}) e do tensor hiperfino (A_{xx} , A_{yy} , A_{zz}) do Nitrogênio, inseridos na bicamada lipídica e a forma das linhas de espectro do RPE, compõem o espectro do marcador de spin de nitróxido. Geralmente o sistema molecular é simétrico, com $A_{zz}=A_{||}$, $A_{xx}=A_{yy}=A_{\perp}$ e $g_{zz}=g_{||}$, $g_{xx}=g_{yy}=g_{\perp}$.

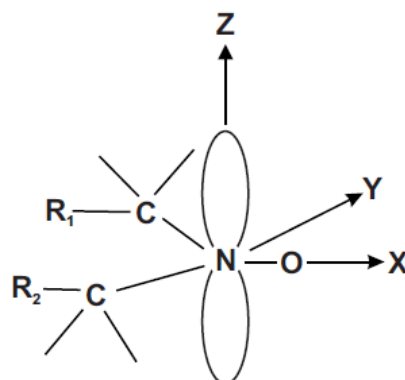


Figura 23. Orientação dos eixos principais dos tensores g e A no radical nitróxido.

A figura acima ilustra a orientação dos Tensores A e g , onde o eixo x indica a direção da ligação N–O, o eixo z a direção do orbital $2p\pi$ do nitrogênio e o eixo y , encontra-se perpendicular aos demais eixos.

Como o orbital localiza-se no eixo z, este eixo contém a maior densidade eletrônica. Com isto, quando o campo externo é aplicado nesta direção, o valor do tensor de desdobramento hiperfino será maior que nas situações em que o campo magnético for aplicado no eixo x ou y, onde geralmente $A_{zz} \sim 32$, $A_{xx} \sim A_{yy} \sim 6$. Ainda neste sentido, a mudança da direção do campo em relação aos eixos do nitróxido também causa alterações na posição dos espectros em relação, por conta da variação valor do fator g, onde temos $g_{xx} = 2.0090G$, $g_{yy} = 2.0060G$, $g_{zz} = 2.0027G$. Para direção do campo, é mostrada a seguir a disposição das linhas espectrais:

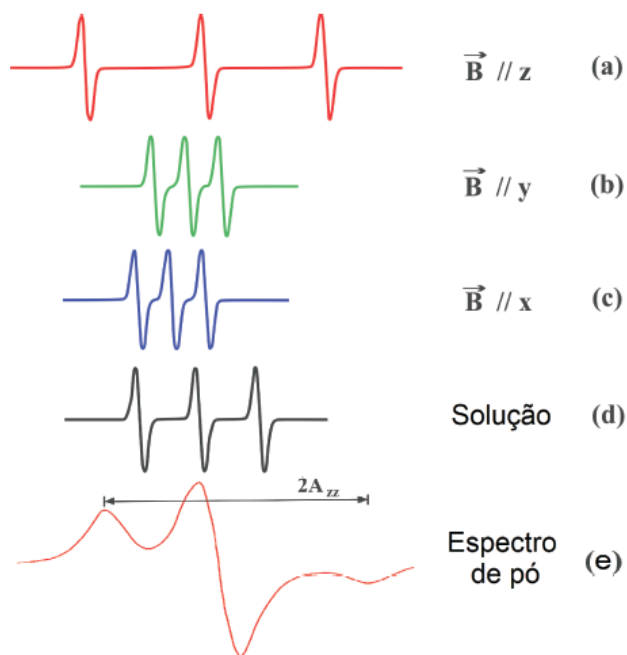


Figura 24. Espectro de RPE ilustrando a anisotropia do fator g e da constante de acoplamento hiperfino (a) Campo magnético aplicado paralelo ao eixo z, (b) paralelo ao eixo y e (c) paralelo ao eixo x. (d) Espectro do marcador em solução (o radical gira rapidamente e a anisotropia do espectro desaparece, sendo observado apenas a média) e (e) espectro obtido de pó de cristal triturado a $-70^{\circ}C$, onde aparecem contribuições de todas as orientações ao mesmo tempo [65].

Quando o marcador consegue se movimentar rapidamente, o espectro formado será o de solução (d). Isto ocorre, pois o tensor da interação dipolo-dipolo possui traço nulo, fazendo esta interação desaparecer, restando apenas a interação de Fermi que é constante no tempo e independente do movimento do marcador. O inverso, quando o marcador possui movimento lento, também pode ocorrer, exibindo um espectro de pó (e). Nesta situação, as contribuições das diferentes orientações da interação dipolar fazem com que a média temporal não seja mais efetiva, logo o tensor interação dipolo-dipolo não mais possui traço nulo [56].

Vale lembrar que, o movimento do grupo nitróxido não é relevante, mas sim o movimento da molécula a qual ele se encontra ligado. Nas membranas biológicas, o eixo do

marcador pode assumir qualquer direção em relação à orientação do campo magnético externo, cujos valores máximos de desdobramentos ocorrem quando uma determinada população de spins possuírem as cadeias carbônicas paralelas ao campo. Quando tais cadeias estiverem dispostas de forma perpendicular a tal campo, o desdobramento será mínimo.

Partindo do espectro de pó, temos a situação onde o desdobramento hiperfino máximo é $2A_{zz}$, e na medida em que o marcador ganha velocidade de movimento, o desdobramento aparente máximo recebe o nome de $2A_{\parallel}$. Este parâmetro diminui à medida que o movimento rotacional aumenta, destacando assim ao $2A_{\parallel}$, a avaliação do grau de movimento do marcador.

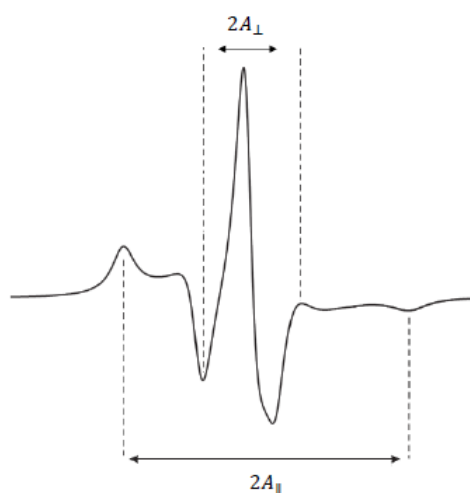


Figura 25. Espectro de EPR do marcador 5-DAS em temperatura ambiente com a indicação dos parâmetros espectrais $2A_{\parallel}$ e $2A_{\perp}$.

Onde os fatores A_{\perp} e A_{\parallel} , refletem a anisotropia dos fatores g e A . Vale ressaltar que em solução, devido às rápidas flutuações do marcador, a anisotropia é eliminada, não sendo possível mais observar entre os valores $2A_{\perp}$ e $2A_{\parallel}$. Neste estado de movimento, os espectros do marcador exibem um comportamento de caráter isotrópico, onde os tensores em questão são substituídos pelas médias aritméticas de suas componentes matriciais no sistema de coordenadas do grupo nitróxido.

Dos valores do tensor de desdobramento hiperfino, pode ser definido um parâmetro de ordem (S):

$$S = \frac{A_{\parallel} - A_{\perp}}{A_{zz} - \frac{1}{2}(A_{xx} + A_{yy})} \quad (29)$$

Com A_{\perp} e A_{\parallel} sendo medidos diretamente do espectro e A_{xx} , A_{yy} e A_{zz} , obtidos do espectro de pó. O parâmetro de ordem é uma medida da orientação molecular em relação ao eixo de referência, tendo seu valor variando de 0 até 1. Quando $S = 1$, a ordem dos lipídios na membrana é grande e descreve enrijecimento máximo. Para $S = 0$, o movimento é completamente isotrópico. Ou seja, quanto menor o valor de S , mais fluída é a região do centro paramagnético do marcador, descrevendo assim uma maior mobilidade rotacional da membrana na qual está inserido.

3.3 Citometria de Fluxo

A técnica de citometria de Fluxo tem como objetivo a contagem e análise de células. O equipamento que executa a técnica é chamado Citômetro de Fluxo. [100]. As células são inicialmente marcadas com fluorocromos, específicos do antígeno celular do estudo. Após a preparação da amostra, a suspensão celular é levada ao aparelho, onde por escoamento vertical e afunilamento é alinhada permitindo a passagem de células em fluxo laminar, onde logo em seguida, a suspensão sofre a incidência de um laser posicionado na horizontal. Então, parte da energia do laser é absorvida pelo fluorocromo, onde após o relaxamento, a radiação é emitida pelo fluorocromo num comprimento de onda específico. O sistema óptico integrado ao equipamento capta a luz emitida e transfere esta informação ao computador. O sistema óptico é sensível a diversos comprimentos de onda, permitindo que mais de um fluorocromo seja lido ao mesmo tempo. O resultado das populações celulares marcadas é plotado graficamente, podendo ser uni, bi ou tridimensional. [101]

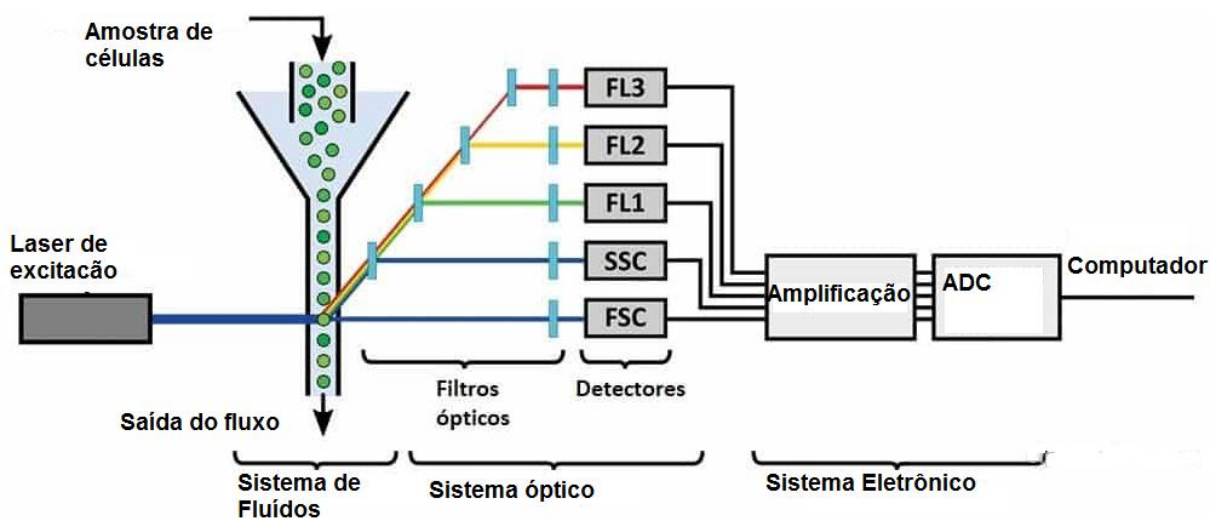


Figura 26. Esquema do citômetro de fluxo. Retirado e alterado de [102]

Como pode ser visto na figura acima, o equipamento Citômetro de Fluxo é composto por diversas subunidades. A primeira é o sistema fluído, uma câmara onde as células são

alinhas, impactadas pelo laser e logo em seguida descartadas. A fonte emissora de luz pode ser uma lâmpada de xenônio ou mercúrio, lasers de argônio ou laser de diodos nas cores azul, verde, vermelho e violeta. Logo após a incidência da luz na célula, ocorre a dispersão e reflexão, com os detectores sendo ativados no local onde o fluxo incide através do feixe de laser. A luz que é dispersa na horizontal do laser incidente é classificada como espalhamento horizontal (do inglês Forward Scatter – SCC), e fornece informações a respeito do volume e dimensões da célula. A luz que é refletida perpendicularmente a linha de ação do laser, recebe o nome de espalhamento lateral (Side Scatter – SSC) e descreve a complexidade intracelular, como organelas, formato nuclear e quantidade e tipos de grânulos citoplasmáticos, bem como a deformidade da membrana. Além destes detectores, temos também o detector de fluorescência, onde o espalhamento fornece informações a respeito dos fluorocromos [103]. O sinal do espalhamento frontal é coletado pelo fotodiodo de silicone, enquanto que os sinais do espalhamento lateral são direcionados aos fotomultiplicadores e logo em seguida chegam aos detectores. O sistema de amplificação codifica e processa os sinais na forma linear ou logarítmica. Por fim, o sistema computacional analisa e processa os sinais, emitindo os resultados [103].

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes Químicos

Os surfactantes, marcadores de spin 4-maleimido-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxilo (MAL-6) e ácido 5-doxil-esteárico (5-DAS), brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), azul de metileno e os meios de cultura Grace e RPMI 1640 foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). O restante dos reagentes como tampões e meios de cultura foram utilizados com o maior grau de pureza possível e preparados com água Mili-Q.

4.2 Parasitas

A cepa utilizada para a realização da pesquisa foi *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/75/Josefa) armazenada no Leishbank (Banco de leishmanias do Laboratório de Imunobiologia das Leishmanioses, no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás (UFG)). O cultivo do parasita foi feito em placa de 24 poços, mantidos à temperatura de 26°C em meio Grace de cultura suplementado a 20% de Soro Fetal Bovino (SFB) inativado, 2

mM de L-Glutamina 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina. Os repiques eram realizados a cada três dias, transferindo 50 µl de um poço ao outro e complementando este novo poço com 1 ml de Meio Grace.

As expansões eram feitas retirando toda a solução contida em um poço e despejada em tubo falcon, completando o volume com meio Grace 20% até alcançar 50 ml. Depois disso o recipiente foi então armazenado na estufa à 26°C durante 6 ou 7 dias, para alcançar o maior número formas metacíclicas do parasita.

Decorrido este tempo, o parasita foi preparado para os experimentos, levando o tubo falcon à centrífuga a 1400 x g e 10°C durante 10 min. O sobrenadante foi despejado e o precipitado ressuspenso em 1 ml de meio Grace desta vez suplementado a 10% de SFB. A contagem foi realizada com o auxílio da Câmara de Neubauer, diluindo 10 µL da solução obtida em 990 µL de Formalina.

4.3. Macrófagos J774.A1

As células estão localizadas no Leishbank (Banco de leishmanias do Laboratório de Imunobiologia das Leishmanioses, no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás (UFG)).

O cultivo foi realizado em garrafas de 100 ml preenchidas num volume de 10 ml com meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB, 100 U/ml penicilina, 100 mM de bicarbonato de sódio e 100 µg/ml estreptomicina. As garrafas foram armazenadas levemente tombadas para o lado para aumentar a superfície de contato dos macrófagos com o meio e as paredes do recipiente, além de serem deixadas com as tampas levemente abertas para manter o fornecimento de oxigênio às células. Depois de preparadas, as mesmas foram mantidas à temperatura de 37°C, sendo realizada a troca de meio RPMI 1640 a cada três dias.

As expansões foram feitas em garrafas de mesma capacidade e igual volume de meio RPMI, em média a partir de 15 dias após o início do cultivo das células, onde o número de macrófagos permitia expansão e reaproveitamento de algumas células (já que estas se aderem à parede do recipiente), sendo necessária apenas uma troca de meio para continuar o cultivo na garrafa inicial.

Células J774.A1 foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de FCS, 2mM de L-glutamina, 11mM de bicarbonato de sódio, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. Um total de 4×10^6 células/mL foram

infectadas *L. amazonensis* marcadas com proteína fluorescente verde por 3 h (GFP). No 6º dia de crescimento Promastigotas de *L. amazonensis* marcadas com GFP cultivadas em meio Grace suplementado com 10% FCS. Frequentemente, os parasitas marcados com GFP foram selecionados usando 30 µg/mL Higromicina B. Após 3 h de infecção, as células foram lavadas com 1x PBS para remoção de parasitas não internalizados e cultivados por mais 24 horas na presença de MT ou surfactantes em diferentes concentrações. As células foram preparadas para análise com o auxílio de gelo e o separador celular para desprendimento destas das paredes da placa. As células foram lavadas 2 vezes com PBS e incubadas com paraformaldeído a 1% e analisadas por citometria de fluxo no Citômetro de Fluxo BD Accuri™ C6 Flow Cytometry (BD Bioscience, San Jose, CA, EUA). As células foram identificadas por tamanho e complexidade. Os dados foram analisados utilizando o software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, EUA).

4.4 Viabilidade Celular pelo teste de MTT nos parasitas

A viabilidade dos parasitas presentes nos poços foi quantificada pelo teste de MTT. O MTT é um sal de tetrazólio de coloração amarelada e sensível à luminosidade [67]. Sua função é embasada na ação mitocondrial do meio onde é aplicado, ou seja, o processo de respiração celular dos parasitas reduz o MTT, por meio da ação da desidrogenase, transformando-o em outro composto de coloração roxa, conhecido como Formazan.

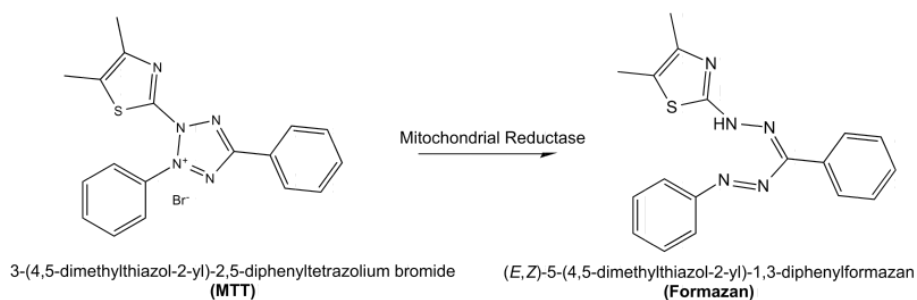


Figura 27. Reação de Redução do MTT em Formazan. Os radicais Br⁻ e N⁺ reagem, ocorrendo a quebra de uma ligação simples de N com a adição de um radical de Hidrogênio proveniente da atividade mitocondrial. Retirado de [68].

Vale ressaltar que o Formazan é um composto hidrofóbico e que na reação de redução MTT-Formazan, quanto mais intensa for a coloração roxa, maior será a viabilidade celular naquele local. Além da eficácia e fácil manuseio do MTT, tal composto foi utilizado pela

baixa faixa de absorção que o mesmo possui, interferindo minimamente no processo de obtenção dos dados na espectrofotometria [69].

Para o início dos experimentos, as moléculas também foram diluídas em Meio Grace a 10% de SFB, e diluídas em série em todas as colunas da placa de 96 poços, com redução na concentração do composto em 50% de um poço a outro. Da quantidade de parasitas obtida na contagem foram realizadas diluições para 1×10^8 , 4×10^7 , 1×10^7 e 5×10^6 células/ml em uma placa, números estes referentes à concentração dos parasitas no meio (parasitas/ml). Cada fileira foi preenchida com sua respectiva solução até o oitavo poço, sendo as quantidades de 50 μ l para as três concentrações mais altas e 100 μ l para a concentração de 5×10^6 parasitas/mL, todos diluídos em meio Grace a 10% de SFB. Terminada as diluições na placa, o volume final seria de 100 μ L para todos os poços das três concentrações mais altas e 200 μ L para a concentração contendo 5×10^6 células/mL.

Finalizada esta etapa do experimento, a placa foi levada à estufa na temperatura de 26 °C durante um período de 24 h. Decorrido este tempo, cada poço recebeu 20 μ l de MTT, retornando a placa a estufa às mesmas configurações durante cerca de 3 ou 4 h, tempo necessário para o MTT reagir completamente. Após isto, cada poço recebeu 50 μ L de SDS, para diluir os cristais de Formazan formados e, finalmente, foram realizadas as medidas no espectrofotômetro UV/vis a 540 nm.

4.5 Viabilidade Celular pelo teste de MTT nos macrófagos

A preparação dos macrófagos para os experimentos foi feita com o contato direto de gelo na superfície da garrafa, para auxiliar no desprendimento das células das paredes do recipiente. Além disso, empregou-se também o uso Cell Scraper (ou espalhador celular em português) para maximizar a remoção das células presas à superfície do recipiente, utilizando-se de movimentos brandos para evitar a lise celular. Já a contagem das células foi também feita na câmara de Neubauer, contudo diluindo 20 μ L da solução contendo os macrófagos em 980 μ L de azul de tripano.

As moléculas para o experimento foram diluídas a 800 μ M em meio RPMI 1640, homogeneizando brandamente para melhor diluição. Então, as mesmas foram diluídas em série numa placa de 96 poços, em colunas diferentes (uma para cada composto) até o oitavo poço, sendo que o primeiro poço recebia a maior concentração da molécula e o último poço a menor, seguindo sempre a proporção de 50% de redução da concentração a cada novo poço

diluído. Então, a partir do número de macrófagos determinados na contagem, iniciaram-se as diluições nas seguintes concentrações: 1×10^7 , 4×10^6 , 1×10^6 e 5×10^5 , células/mL. Com isto, foram acrescentados 100 μ L de cada uma destas concentrações nas fileiras, sendo a primeira fileira 1×10^7 células/mL, a segunda 4×10^6 células/mL e assim por diante.

Finalizada esta etapa, a placa foi levada para a estufa à temperatura de 37 °C durante 24 h. Decorrido este tempo, a cada poço então foi acrescido 20 μ L de MTT e então retornada à placa para a estufa novamente. Passadas 5 h, foram acrescentadas a cada poço 50 μ L de SDS e feita a medição no espectrofotômetro UV/vis, em comprimento de onda de 540 nm.

4.6 Potencial Hemolítico em PBS

O sangue foi doado pelos colaboradores do laboratório e armazenado em tubos de EDTA à temperatura de 4 °C. O sangue integral foi então diluído em Tampão Fosfato Salino (PBS), seguindo a proporção de um volume de sangue para três volumes de PBS, homogeneizando a solução e levando a centrífuga logo em seguida. As configurações para a lavagem foram 800 x g de rotação, tempo de 10 min e temperatura de 4 °C. Após isto, o sobrenadante, contendo o plasma e células brancas, foi cuidadosamente removido por aspiração, restando apenas o hematócrito precipitado que foi logo em seguida ressuspensionado em PBS e levado a centrífuga novamente às mesmas configurações já mencionadas. Tal procedimento foi repetido mais três vezes.

Finalizada a lavagem, o hematócrito foi então diluído em PBS nas concentrações de 0,5%, 2%, 8% e 32%. O mesmo foi feito com os surfactantes e MT, de modo a obter 2,5mM, 5mM, 10mM e 20mM. O maior valor foi adicionado ao hematócrito de 32%, diluindo em série na proporção de 50% até a oitava amostra. O hematócrito de 8% recebeu a quantidade inicial de 10 mM, diluindo do mesmo modo as amostras e hematócritos seguintes, partindo com 5 mM para o hematócrito de 2% e 2,5 mM para o hematócrito de 0,5%.

O volume final de cada solução após a diluição das moléculas foi de 1200 μ L para o hematócrito 0,5%, 300 μ L para 2% e 100 μ L para os hematócritos 8% e 32%. A incubação foi executada por 2 h à temperatura de 36 ± 1 °C. Após isto, todas as amostras tiveram seus volumes completados até 1,4 mL e levadas à centrífuga nas configurações citadas anteriormente. Do sobrenadante, foi medida a percentagem de hemólise, baseando-se na absorbância da hemoglobina em comprimento de onda de 540 nm, calibrando o equipamento com PBS.

4.7 Potencial Hemolítico em Sangue Integral

Para medir o potencial hemolítico dos detergentes e da MT no sangue integral, o plasma foi separado das células sanguíneas por centrifugação a 2800 x g durante 10 min a 4 °C, e 10 amostras contendo 58 µL de plasma e os compostos em diferentes concentrações foram preparados pela dissolução da molécula diretamente no plasma e usando diluições seriadas. Em seguida, foram adicionados 42 µL das células sanguíneas separadas a cada amostra para reconstituir o sangue integral. As amostras foram incubadas por 24 h a 7 ± 1 °C, e durante esse período, as amostras foram suavemente agitadas várias vezes. Decorrido este tempo, cada amostra teve seu volume completado para 1,4 mL com PBS e novamente centrifugado. As porcentagens de hemólise foram determinadas conforme descrito acima.

4.8 Preparação e marcação das amostras para a espectroscopia de RPE

Para incorporar o 5-DSA nas membranas de Leishmania e eritrócitos, um filme spin-label foi preparado no fundo de um tubo de ensaio, adicionando uma alíquota de 1µL de uma solução estoque de 5-DSA (4 mg/mL) em etanol e transferindo para um tubo de ensaio de vidro e após evaporação do solvente. Foi adicionado 50 µL do meio Grace contendo 1×10^8 células ao spinlabel filme, seguido de agitação suave. A marcação de spin das proteínas da membrana da Leishmania e dos eritrócitos foi realizada incubando uma suspensão celular com 2mM do rótulo de spin maleimido 6-MSL, durante 90 min a 26 °C. Para remover o excesso de marcador de spin, a amostra foi centrifugada (3.000xg, 4 °C) por 10 min e depois ressuspensa em meio Grace. Este procedimento foi repetido seis vezes. Após a marcação, as moléculas (surfactantes e MT) diluídas no meio Grace foram adicionadas as amostras. Para as medições de EPR, as amostras foram transferidas para tubos capilares de 1mm, que foram selados com o auxílio de uma chama.

Um espectrômetro EPR EMX-Plus da Bruker (Rheinstetten, Alemanha) foi usado para realizar as medidas de RPE. Os espectros foram registrados usando as seguintes configurações: potência de microondas, 2 mW; frequência de modulação, 100 kHz; amplitude de modulação, 1,0 G; campo magnético de varredura, 100 G; tempo de varredura, 168 s; e temperatura da amostra, 25°C.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ação dos surfactantes e MT nos eritrócitos

5.1.1 Efeitos na dinâmica molecular avaliados por RPE

A Figura 28 (painel A) mostra os espectros EPR do spin Label 5-DSA incorporado na membrana do eritrócito e 6-MSL ligado às proteínas da membrana do eritrócito (Painel B), para o controle e amostras tratadas com duas concentrações de MT e os surfactantes HPS, CTAC e SDS. Na concentração de 1×10^9 moléculas/célula, os espectros de RPE mostraram, em ambos os marcadores de spin, reduções consideráveis no parâmetro $2 A_{//}$, indicando um grande aumento na dinâmica molecular da membrana celular. Este resultado demonstra que estes compostos podem se ligar em grandes quantidades à membrana, causando mudanças estruturais. Para o 6-MSL, as variações nos valores do parâmetro $2 A_{//}$ entre a MT e os detergentes na mesma concentração não foram substanciais na faixa de erro experimental (0,5 G). As amostras tratadas na proporção molecular de 1×10^9 moléculas/célula mostraram uma redução no parâmetro $2 A_{//}$ de 6-MSL de 2,5 a 3,0 G em relação ao controle (67,2 G), e reduções adicionais foram observadas ao comparar as concentrações de 1 e 3×10^9 moléculas/célula. No caso de 5-DSA, o resultado foi diferente para o SDS nas duas concentrações analisadas, mostrando aumentos menores na dinâmica molecular do que os outros compostos.

A espectroscopia de RPE do marcador de spin lipídico na membrana celular identificou duas populações de marcador com estados distintos de mobilidade. Sondas de spin com menos mobilidade foram associadas aos lipídios de contorno, que representam aquelas sondas de spin que preferencialmente envolve a superfície hidrofóbica das proteínas da membrana da célula, enquanto que as sondas de spin mais móveis são aquelas localizadas na bicamada, longe da proteína [70,71]. Devido ao alto teor de proteína da membrana do eritrócito, o espectro de RPE do 5-DSA mostra apenas a componente espectral correspondente ao marcador de spin localizado no contorno da proteína. Desta forma, as mudanças nos espectros do 5-DSA causados pelos surfactantes e a MT estão associados principalmente com mudanças na dinâmica do componente da proteína da membrana.

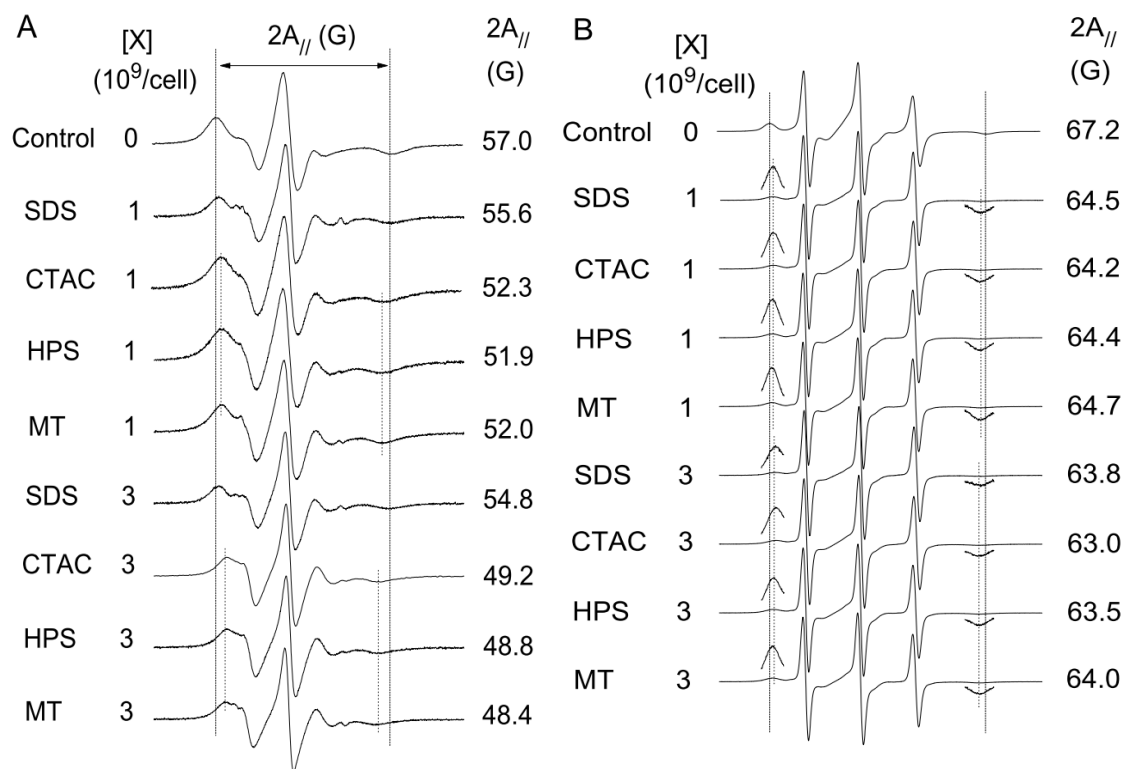


Figura 28. Espectro de RPE do marcador de spin 5-DSA incorporado nas membranas dos eritrócitos (painel A) e 6-MSL ligado covalentemente aos grupos SH (painel B) das proteínas da membrana dos eritrócitos para células não tratadas (controle) e tratadas com duas concentrações de HPS, CTAC e SDS e MT em suspensão de PBS. As concentrações são expressas em número de moléculas por célula. Os valores do parâmetro de RPE $2A_{//}$ (divisão hiperfina externa), que é dado pela separação em unidades de campo magnético entre o primeiro pico e o último pico invertido do espectro, também são indicados. Como no caso do 6-MSL estes picos foram de baixa intensidade, foram amplificados 10 vezes para melhor visualização. O erro experimental estimado para o parâmetro $2A_{//}$ é de 0,5 G. Estes espectros de RPE são representativos de duas experiências independentes. A faixa total de varredura do campo magnético em cada espectro de RPE foi de 100 G e a intensidade está em unidades arbitrárias.

No caso da MT, estudos anteriores mostraram que ela não causa mudanças nas membranas modelo quando preparadas usando um rigoroso processo de extrusão. Por exemplo, os espectros RPE de 5-DSA em vesículas extrudadas de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina (DPPC) não mostraram alterações até 35 mol% de MT [72].

Em vesículas preparadas com misturas lipídicas contendo colesterol e esfingomiéline, 20 mol% de MT não causam mudanças significativas na fluidez da bicamada lipídica, como detectado com a sonda 5-DSA [73]. Assim, as grandes mudanças indicadas pelo 5-DSA devem estar associadas a alterações nos componentes proteicos da membrana. A sonda proteica 6-MSL também detectou aumentos na dinâmica das cadeias polipeptídicas (Figura

28B). Os espectros de RPE de 6-MSL ligados aos grupos SH na membrana do eritrócito mostram uma forma de linha espectral típica de proteínas em geral, com um valor de $2 A_{//}$ de ~ 67 G a 25 °C [73,74].

Para o marcador de spin de proteínas, os espectros de RPE são geralmente compostos por duas componentes correspondentes a duas populações de marcador de spin, que são associados a dois estados de mobilidade da sonda, fortemente (S) e fracamente (W) imobilizados. A componente mais móvel W, apresenta três linhas de ressonância estreitas com um desdobramento hiperfino isotrópico, $2a_0$, igual a $17,1$ G, o que é consistente com uma fração de nitróxido dissolvida em tampão [73,74]. Já a componente menos móvel S, mostra fortes interações entre a cadeia lateral de nitróxido e a estrutura da proteína. Essas interações incluem essencialmente, a formação de ligações de hidrogênio entre o radical nitróxido e qualquer doador de hidrogênio da proteína, como deduzido a partir do valor observado do componente Z do tensor hiperfino do nitróxido, A_{zz} , que pode ser avaliado por simulação espectral ou através medição direta a -140 °C [75].

Assim, os picos de ressonância que foram amplificados na Figura 28B pertencem a componente menos móvel S. A medição do parâmetro $2 A_{//}$, que é baseada nas posições do campo magnético destes picos, reflete o movimento segmentar da estrutura molecular da proteína [75].

Quando a membrana dos eritrócitos é marcada com 6-MSL, a intensidade relativa dos picos da componente S é muito baixa, ao contrário do caso das membranas isoladas da célula (ghosts de eritrócito) marcadas com o mesmo spin-label, onde a componente S predomina no espectro RPE [76]. Esse resultado sugere que o lado interno da membrana do eritrócito tem uma população muito maior de grupos sulfidríla do que o lado externo. Outro fator que pode contribuir para essa diferença nas intensidades relativas entre estas duas componentes é que possivelmente o 6-MSL também pode reagir com aminas primárias (N-terminal, lisina, arginina) [77], para as quais a componente W predominará no sinal do RPE. O fato da intensidade relativa dos picos da componente S diminuir ainda mais com o tratamento com os surfactantes e a MT, indicam que essas moléculas estabilizam as conformações das proteínas que são mais expostas ao solvente [73,74].

As três linhas estreitas de ressonância, que são predominantes nos espectros do 6-MSL (componente mais móvel), são sensíveis à microviscosidade do meio local e seu perfil de linha foi essencialmente o mesmo para todas as amostras.

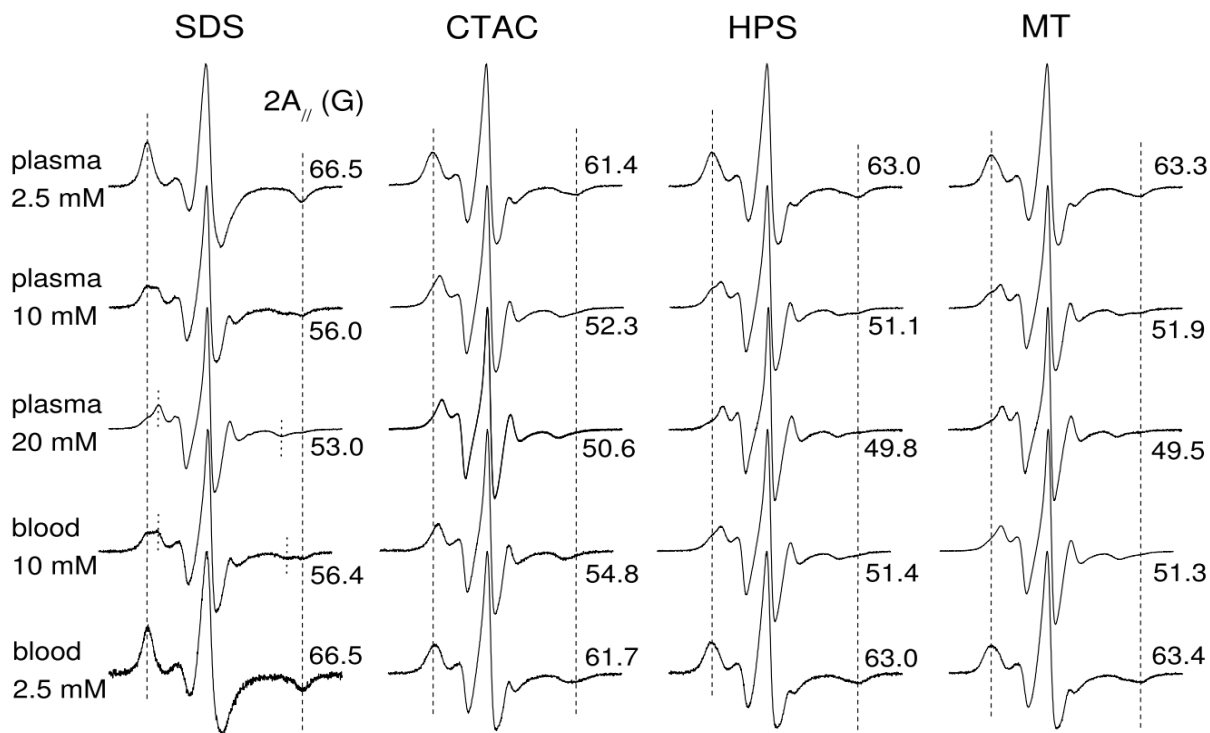


Figura 29. Espectros de RPE do 5-DSA no plasma e no sangue integral tratados com diferentes concentrações de SDS, CTAC, HPS e MT. Os valores do parâmetro de RPE $2A_{//}$ (definido na Figura 27) são indicados; o valor $2A_{//}$ para os componentes menos e mais restritos de mobilidade foram indicados acima e abaixo de cada espectro, respectivamente. O espectro de controle do 5-DSA para sangue ou plasma não tratado tem uma forma de linha equivalente à do plasma tratado com 2,5 mM de CTAC ou MT, tendo um $2A_{//}$ de 62,8 G.

Para comparar os efeitos dos surfactantes e MT sobre a membrana dos eritrócitos para células suspensas em PBS e em sangue integral, realizamos vários experimentos de RPE usando o marcador de spin 5-DSA (Figura 29). O espectro de RPE de 5-DSA no plasma foi essencialmente o mesmo que o observado para BSA pura [78], com um parâmetro de RPE $2A_{//}$ de 62,8 G. Em geral, duas componentes espectrais diferindo em mobilidade foram observados nos espectros de RPE da Figura 28. Para a concentração de 2,5 mM em ambas as soluções contendo apenas plasma ou em sangue total, apenas o componente de movimento restrito foi observado. No entanto, a mobilidade variou de acordo com o tipo de carga das moléculas estudadas. Dado o erro experimental estimado no parâmetro $2A_{//}$ (0,5 G), as moléculas zwitteriônicas de MT e HPS não foram diferentes da amostra controle (62,8 G), enquanto que o catiônico CTAC aumentou a mobilidade (61,4 G) e o aniônico SDS tornou a proteína bastante rígida (66,5 G). O plasma tratado com os compostos em concentração de 10 ou 20 mM mostrou um componente espectral com maior mobilidade, mas em geral, uma pequena fração do movimento da componente restrita que estava presente na concentração de

2,5 mM ainda permaneceu. No sangue total, os compostos mostraram efeitos semelhantes ao plasma nas mesmas concentrações, com exceção do CTAC em 10 mM. Na verdade, o componente espectral do 5-DSA incorporado na membrana do eritrócito, que tem um valor muito menor de $2 A_{//}$, não foi observada nos espectros, provavelmente devido ao pequeno volume da membrana em relação ao do plasma.

5.1.2 Os efeitos no potencial hemolítico são dependentes da concentração celular

Trabalhos anteriores demonstraram que os valores de HC_{50} da MT dependem da concentração celular experimental [79]. A Figura 30 mostra a dependência dos valores de HC_{50} dos surfactantes na concentração celular. Para uma suspensão de eritrócitos com 1×10^7 células/mL, os valores de HC_{50} dos surfactantes CTAC e HPS ficaram abaixo de $10 \mu\text{M}$, enquanto que para ensaios com uma concentração de eritrócitos de 2×10^9 células/mL, o HC_{50} foi aumentado para $\sim 500 \mu\text{M}$. Essa alteração ocorre quando a molécula de teste se acumula na célula da membrana até atingir a concentração na membrana que causa 50% de hemólise.

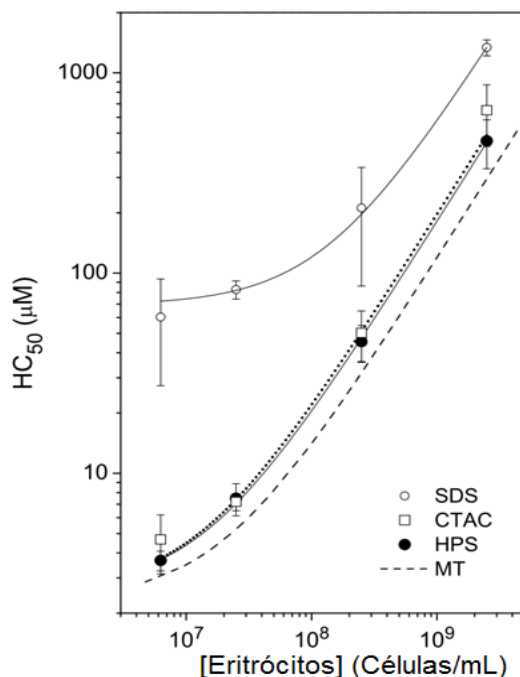


Figura 30. Dados experimentais e curvas teóricas calculadas usando a Eq. (29) para a concentração molecular que produz 50% de hemólise (HC_{50}) versus a concentração de eritrócitos utilizada no experimento.

Aumentar a concentração de células na suspensão requer uma maior concentração da molécula na suspensão para atingir a concentração crítica na membrana devido à maior quantidade de moléculas remanescentes na membrana. A eq. (29) (deduzida abaixo), a qual

descreve a relação entre a concentração celular usada no ensaio e o valor de HC_{50} , envolve o coeficiente de partição membrana-água ($K_{M/W}$), bem como as concentrações de moléculas na membrana (c_m) e na fase aquosa (c_w). Ajustando a equação ao experimento, conforme mostrado na Figura 29, esses parâmetros, que são covariáveis na equação, podem ser determinados. A derivação desta equação pode ser entendida como segue [73].

Considere uma suspensão de células com n_w moles da molécula no meio aquoso e n_m moles na membrana celular. A concentração molar na suspensão celular (c_{sus}) pode ser calculado como:

$$c_{sus} = \frac{n_w + n_m}{V_w + V_m}, \quad (30)$$

onde V_w é o volume do meio aquoso e V_m é a volume de membrana das células na suspensão. A introdução do coeficiente de partição membrana-água $K_{M/W}$ ($K_{M/W} = c_m/c_w$) na Eq. (29) acima, leva a seguinte forma:

$$c_{sus} = \frac{c_w V_w + K_{M/W} c_w V_m}{V_w + V_m} \quad (31)$$

Ou, fatorando o termo c_w :

$$c_{sus} = \left[\frac{(V_w/V_m) + K_{M/W}}{(V_w/V_m) + 1} \right] c_w. \quad (32)$$

Para amostras bem diluídas ($V_w \gg V_m$) ou para moléculas testes hidrofílicas (baixo valores de $K_{M/W}$), o valor do termo entre parênteses se aproxima de 1 e $c_{sus} = c_w$. No entanto, para moléculas hidrofóbicas e concentrações celulares mais altas, uma proporção considerável das moléculas vai para a membrana e a suspensão não pode mais ser considerada homogênea; neste caso, c_{sus} pode ser bem diferente de c_w .

O volume da membrana eritrocitária (V_{mc}) foi estimado previamente como sendo $1,05 \times 10^{-12}$ mL. Foi considerada uma área de superfície celular média de $135 \mu m^2$ e uma espessura de membrana de 78 \AA [70]. Para encontrar V_m em 1 mL de suspensão, basta multiplicar V_{mc} pelo número de células por mL (c_c). V_w é aproximadamente igual a 1 mL, o volume total considerado, pois V_m é muito pequeno (menos de 1% de V_w). Portanto, substituindo V_w/V_m por $(V_{mc} \cdot c_c)^{-1}$, podemos reescrever a Eq. (31) como:

$$c_{sus} = \left[\frac{(V_m \cdot c_c)^{-1} + K_{M/W}}{(V_m \cdot c_c)^{-1} + 1} \right] c_w \cdot \quad (32)$$

Notavelmente, os dados do HC₅₀ na Figura 30 correspondem aos valores de c_{sus} em (32), e os valores encontrados para c_w podem ser descritos como c_{w50} porque estes valores representam a concentração molecular na fase aquosa da suspensão celular que resultou em 50% de hemólise. Além disso, o valor do c_{m50}, que pode ser calculado usando $K_{M/W} = c_{m50}/c_{w50}$, é a concentração crítica na membrana celular que corresponde ao HC₅₀.

Tabela 1. Parâmetros biofísicos associados com as interações dos surfactantes e MT com a membrana do eritrócito, avaliados em PBS.

Células	$K_{M/W} (10^4)^a$	log $K_{M/W}$	$c_{w50} (\mu M)$	$c_{m50} (M)$
SDS	$0,7 \pm 0,1 (A)^b$	3,85	$69,2 \pm 2,4 (A)$	$0,48 \pm 0,09 (A)$
CTAC	$6,8 \pm 1,3 (B)$	4,83	$2,5 \pm 0,8 (B)$	$0,17 \pm 0,05 (B)$
HPS	$5,9 \pm 1,1 (B)$	4,77	$2,6 \pm 0,5 (B)$	$0,15 \pm 0,04 (B)$
MT ^c	4,8	4,68	2,3	0,11

^a Valores obtidos do ajuste da Eq. (32), onde $K_{M/W}$ é o coeficiente de partição, o c_{w50} a concentração molecular no meio aquoso e c_{m50} a concentração da molécula na membrana, concentrações estas necessárias para causar 50% de hemólise.

^b Significância estatística: em cada coluna, os dados indicados com letras distintas são significativamente diferentes com $P < 0,05$.

^c Medido em trabalho anterior, Ref. [64].

Os parâmetros $K_{M/W}$, c_{m50} e c_{w50} obtidos com o ajuste das curvas mostradas na Figura 30 são apresentados na Tabela 1. O SDS mostrou a menor afinidade para a membrana do eritrócito, conforme deduzido do valor $K_{M/W}$ mais baixo, e também foi a molécula que exigiu a maior concentração na membrana para causar ruptura ($c_{m50} = 480 \text{ mM}$). Os dados da Tabela 1, bem como o gráfico da Figura 30, mostram comportamentos semelhantes para as interações de MT, HPS e CTAC com a membrana eritrocitária.

A Figura 31 mostra as curvas hemolíticas dos surfactantes e MT em sangue integral. Essas moléculas foram dissolvidas no plasma e as células sanguíneas foram adicionadas para reconstituir o sangue total. O SDS foi o menos hemolítico, com um HC₅₀ de 10,3 mM, que é aproximadamente cinco vezes maior que a da MT e dos outros dois surfactantes.

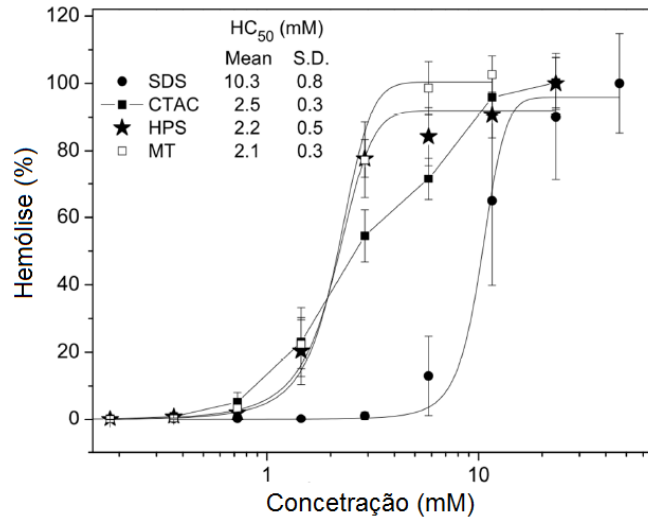


Figura 31. Representação das curvas hemolíticas dos surfactantes em comparativo com a MT em sangue integral. A incubação foi de 24 h à temperatura de $7,5 \pm 1$ °C. A curva do CTAC não apresentou uma sigmoide perfeita (acima de 3 mM a solução já se apresentava turva, sugerindo a formação de micelas).

Para estimar o coeficiente de partição membrana-plasma ($K_{M/P}$) das moléculas no sangue integral, podemos primeiro considerar que V_{mc} ($=1,05 \times 10^{-12}$ mL, ver acima) é 85,7 vezes menor que o volume médio dos eritrócitos (90×10^{-12} mL). Como as moléculas estudadas têm um alto grau de afinidade pela membrana, com valores de $K_{M/W}$ entre 7.000 e 68.000 (Tabela 1), podemos desprezar o número de moléculas dentro da célula onde o meio é predominantemente aquoso (assumindo que a volume de membrana dentro da célula é muito menor do que o volume do plasma). Assumindo um sangue com hematócrito de 42%, a concentração da molécula no plasma para 50% de hemólise (c_{p50}) pode ser calculada como:

$$0.58 (c_{p50}) + 0.42 \left(\frac{c_{m50}}{85.7} \right) = HC_{50} , \quad (34)$$

Para maior clareza, a Eq. (33) considera que o valor de HC_{50} é dado pela soma da fração de plasma no sangue (0,58) multiplicado por c_{p50} com a fração de células (0,42) multiplicada pela concentração média da molécula na célula. Como a concentração da molécula dentro da célula foi negligenciada, a concentração média na célula foi considerada a concentração na membrana (c_{m50}) diluída 85,7 vezes (a razão entre os volumes da célula e da membrana). Com os valores c_{p50} , $K_{M/P}$ pode ser calculado pela razão $K_{M/P} = c_{m50}/c_{p50}$. Os dados obtidos são apresentados na Tabela 2. Esses resultados indicam que as concentrações das moléculas estudadas são mais elevadas no plasma do que no sangue total, o que ocorre porque o meio aquoso, onde a concentração é inferior, é predominante no espaço interno da célula. Outra

observação é que $K_{M/P} \ll K_{M/W}$; no entanto, a concentração dos compostos na membrana celular foi 35-60 vezes maior do que no plasma.

Tabela 2. Parâmetros biofísicos associados com as interações dos surfactantes e MT com a membrana dos eritrócitos no sangue integral.

Células	HC₅₀ (mM)^a	c_{m50} (M)	c_{p50} (mM)	K_{M/P}
SDS	10,3 ± 0,8 (A) ^b	0,48	13,7 ± 0,9 (A)	35 ± 7 (A)
CTAC	2,5 ± 0,3 (B)	0,17	2,9 ± 0,4 (B)	59 ± 16 (A)
HPS	2,2 ± 0,5 (B)	0,15	2,5 ± 0,5 (B)	60 ± 20 (A)
MT	2,1 ± 0,3 (B)	0,11	2,7 ± 0,4 (B)	41 ± 10 (A) ^c

^aHC₅₀ (Figura 30), c_{m50} (Tabela 1) e c_{p50} (Eq. 33), são as concentrações moleculares no sangue, na membrana e no plasma que causam 50% de hemólise; K_{M/P} é o coeficiente de partição membrana-plasma.

^b Significância estatística: em cada coluna, os dados indicados com letras distintas são significativamente diferentes com P < 0,05.

5.1.3 Considerações finais

A espectroscopia de RPE de marcadores de spin detectou a rigidez da albumina causada pelas interações eletrostáticas e hidrofóbicas com SDS em concentrações de até 2,5 mM (Figura 28). Além disso, os espectros de RPE evidenciaram o efeito da ligação do SDS à albumina, mostrando que a proteína ficou com uma fração rígida e outra fração com alta mobilidade, sugerindo que o SDS se liga mais facilmente às proteínas que já possuem maior mobilidade ou maior quantidade de SDS ligado. Na concentração de 10 e 20 mM, as quatro moléculas causaram aumentos consideráveis na dinâmica das proteínas. A interação SDS-BSA já tem sido estudada usando espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS) [78]. No SDS concentrações abaixo da concentração crítica de agregação de 2,2 mM, o SAXS indicou que o surfactante não modifica a estrutura da BSA. No entanto, o início do desdobramento da proteína, que é evidenciado por um aumento no raio de giro R_g e dimensão máxima da proteína D_{max}, ocorre entre o 2,2 mM e 10 mM, onde a adição de SDS leva à formação micelas distribuídas aleatoriamente ao longo da cadeia polipeptídica [80]. Para examinar as mudanças nos espectros de RPE na região de formação das micelas agregadas, foram realizadas medições em altas concentrações dos compostos. Os espectros de RPE indicam que a dinâmica da proteína aumenta continuamente com o aumento da concentração do composto até 20 mM. No entanto, a concentração de 1 mM de MT é suficiente para causar mudanças

significativas nos espectros dos marcadores de spin 5-DSA e 6-MSL em membranas plasmáticas de *Leishmania* [73].

Além disso, essas altas concentrações dos compostos parecem ser fisiologicamente relevantes, pois refletem as altas concentrações que se acumulam nas membranas. Os resultados indicam valores médios de c_{m50} de 480 mM para SDS e entre 110 mM e 170 mM para os demais compostos (Tabela 1). Dentre as moléculas estudadas neste trabalho, a molécula aniônica SDS, apresentou resultados distintos das demais. Em PBS, o SDS apresentou a menor afinidade com a membrana do eritrócito (menor $K_{M/W}$, Tabela 1) e a maior concentração necessária para causar ruptura da membrana (maior c_{m50}). O HC_{50} ocorre para um c_{w50} de 69,2 μ M, que é uma concentração baixa para a formação de micelas pelo SDS em PBS. Para as outras moléculas, os valores de c_{w50} foram de 2,3 a 2,6 μ M, de modo que cada molécula deve particionar entre seus próprios agregados moleculares e a membrana eritrocitária. Outro fator que pode influenciar a distribuição molecular membrana-água é a carga negativa da superfície celular do eritrócito, que ocorre devido à presença dos grupos carboxila dos ácidos siálicos na membrana celular [81]. No entanto, a medição do potencial hemolítico no sangue integral não revelou uma diferença significativa entre os coeficientes de partição membrana-plasma ($K_{M/P}$) dos surfactantes e MT (Tabela 2). Assim, o fato do SDS ser muito menos hemolítico do que os outros compostos não pode ser explicado pela menor quantidade de moléculas que entram na membrana, mas porque o SDS causa um aumento menor na mobilidade das proteínas da membrana eritrocitária. Os experimentos de titulação SDS realizados para avaliar as interações SDS com o plasma sanguíneo mostrou que este surfactante aumenta a rigidez da proteína em concentrações relativamente baixas e aumenta a dinâmica da proteína em concentrações mais altas (Figura 30). Por isso, o aumento da mobilidade nas superfícies das proteínas da membrana dos eritrócitos causadas pelo tratamento com SDS foi provavelmente muito menor do que a dos outros compostos (Figura 27A).

5.2 Ação dos surfactantes e MT nos parasitas de *Leishmania*

5.2.1 Efeitos na dinâmica molecular da membrana avaliados por RPE

A Figura 31 mostra os espectros de RPE dos marcadores de spin 5-DSA (Figura32A) e 6-MSL (Figura32B) em membranas de *Leishmania* para as amostras não tratadas e tratadas com várias concentrações de MT e surfactantes. Para todas as amostras tratadas, os espectros RPE de ambos os marcadores de spin mostraram grandes reduções no parâmetro $2A_{//}$ (divisão

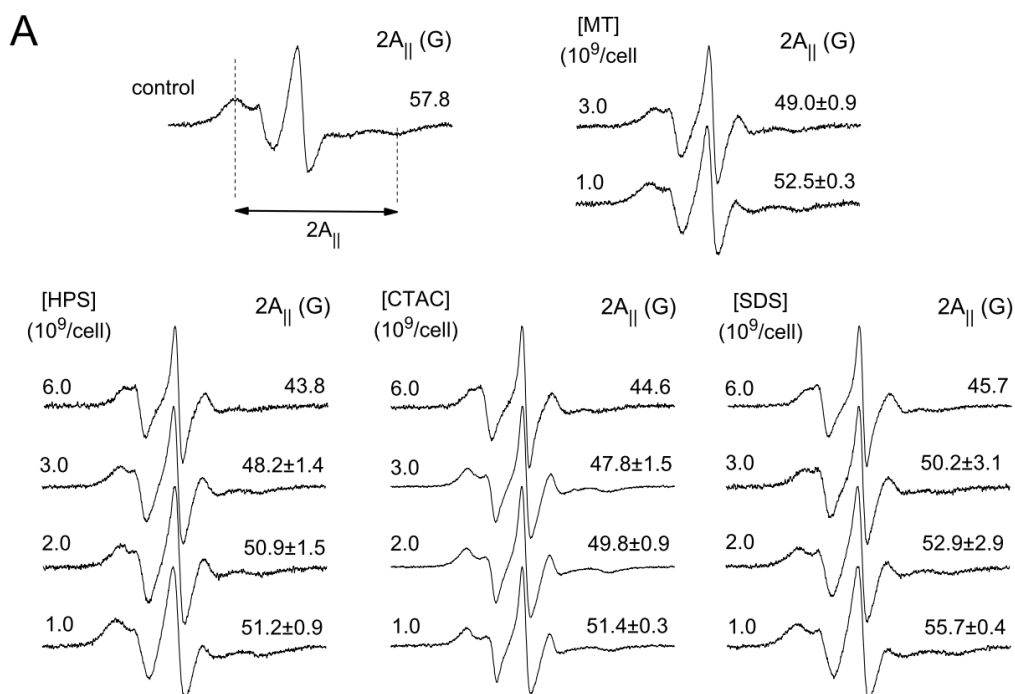
hiperfina externa), indicando notável aumento na dinâmica molecular. Para tratamento com uma concentração de 6×10^9 moléculas/célula, os espectros de 6-MSL mostraram uma diminuição da relação sinal-ruído em comparação com células não tratadas, devido à redução do radical nítróxido por exposição ao conteúdo do citoplasma, indicando lise celular.

As mudanças nos espectros de RPE causadas pelos surfactantes em várias concentrações foram semelhantes, exceto para o SDS e a sonda 5-DSA, em que o parâmetro $2A_{//}$ mostrou valores consideravelmente mais altos para o SDS em concentrações de 1 e 3×10^9 moléculas/célula. Na membrana da célula, a sonda 5-DSA se comporta como lipídio anular ou de contorno, que preferencialmente circunda a superfície hidrofóbica das proteínas de membrana [82,83]. Por causa dessas interações com as proteínas da membrana, o 5-DSA pode monitorar a dinâmica na periferia proteica na bicamada lipídica. Assim, as mudanças nos espectros de 5-DSA causadas pelos surfactantes e MT estão associadas principalmente com mudanças na dinâmica da componente da proteína da membrana.

Estudos anteriores mostraram que a MT não causa alterações nas membranas modelos quando preparadas através de um rigoroso processo de extrusão. Por exemplo, os espectros de RPE de 5-DSA em vesículas extrusadas de DPPC não apresentaram alterações até 35 mol% de MT [75]. Estes experimentos foram realizados alta concentração celular (2×10^9 células/mL). Em um trabalho anterior, para esta concentração celular, o valor do IC_{50} da MT aumentou para aproximadamente 1 mM ($0,3 \times 10^9$ moléculas/célula), e nesta concentração de MT, uma significativa alteração no parâmetro $2A_{//}$ já foi observada, indicando uma associação entre a inibição do crescimento parasitário e alterações na dinâmica de proteínas da membrana celular [73]. Os espectros de RPE da Figura 31 também mostra que a dinâmica da proteína aumenta progressivamente ao longo de uma faixa de concentração longa de aproximadamente 1 a 20 mM de MT ou surfactantes, e este resultado está de acordo com a visão de que estes compostos ligam-se em grandes quantidades às proteínas da membrana.

Os espectros de RPE em proteínas marcadas com spin, como os do 6-MSL apresentados na Figura 30B são geralmente compostos por duas componentes espectrais correspondendo a duas populações de sondas que diferem em mobilidade, que são tecnicamente denotados por fortemente (S) e fracamente (W) imobilizados componentes [84,85]. Conforme descrito anteriormente [73,74], a componente de maior mobilidade W, que apresenta três linhas de ressonância estreitas que são predominantes nos espectros RPE da Figura 30B, tem um desdobramento hiperfino isotrópico, $2a_0$, de 17,1 G, resultante de uma fração de sondas com o nítróxido dissolvido no tampão. Por outro lado, a menor mobilidade

da componente S, é devido a fortes interações entre a cadeia lateral do nitróxido e a proteína da cadeia central. Entre essas interações, uma ligação de hidrogênio é formada entre o radical nitróxido e a cadeia polipeptídica lateral, conforme deduzido do valor observado para o componente z do tensor hiperfino do N-14, A_{zz} , que como já foi mencionado pode ser avaliado a partir da simulação espectral ou medido diretamente no espectro obtido a temperaturas inferiores a $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$ (o valor de $2A_{||}$ tende para $2A_{zz} = 70\text{ G}$). Essas duas componentes estão em equilíbrio termodinâmico, e as baixas temperaturas favorecem a formação da componente S. No instante em que a cadeia lateral do nitróxido é impedida de se movimentar na proteína (configuração S), sua mobilidade reflete o movimento segmentar do esqueleto proteico.



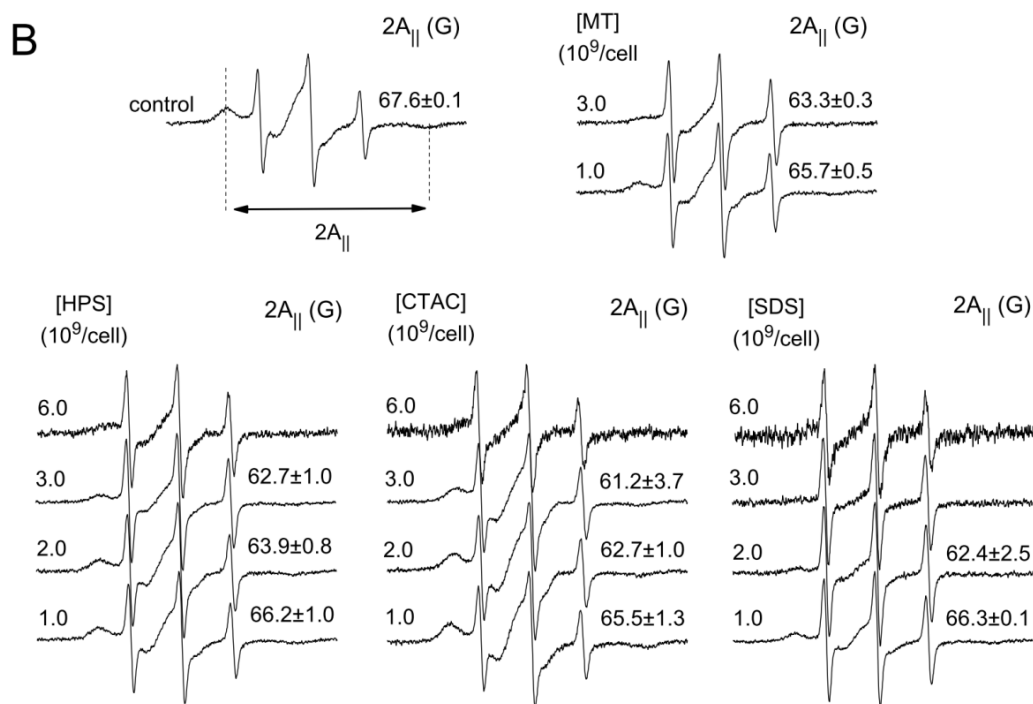


Figura 32. Espectros de RPE do marcador de spin 5-DSA incorporado em membranas de *Leishmania amazonensis* promastigotas (painel A) e do marcador 6-MSL ligado covalentemente aos grupos SH das proteínas da membrana de *Leishmania* (painel B) para amostras de células não tratadas (controle) e tratadas com quatro concentrações de HPS, CTAC e SDS e duas para MT. As concentrações são expressas em número de moléculas por célula. Os valores do parâmetro de RPE $2A_{||}$, que é dado pela separação em unidades de campo magnético entre o primeiro pico e o último pico invertido do espectro, também são indicados.

5.2.2 As concentrações antiproliferativas e citotóxicas dos compostos são dependentes da concentração de células usadas no ensaio

Os valores IC_{50} de surfactantes e MT medidos para promastigotas de *L. amazonensis* foram dependentes da concentração de células usada no experimento (Figura 33). Estes compostos também mostraram um comportamento dependente da concentração celular para valores de CC_{50} medidos na linha celular de macrófagos J774.A1 (Figura 34). Moléculas hidrofóbicas se acumulam na membrana celular e exibem esse tipo de comportamento porque elas têm uma distribuição não homogênea na suspensão celular. Assim, a concentração inibitória ou citotoxicidade a ser medida é influenciada pela quantidade de membrana celular na suspensão.

A equação que descreve a variação dos valores de IC_{50} ou CC_{50} com a concentração de células de ensaio tem como covariante os já citados, coeficiente de partição membrana-

água ($K_{M/W}$) da molécula de teste, bem como as concentrações moleculares na membrana celular (c_{m50}) e fase aquosa (c_{w50}) no IC_{50} (ou CC_{50}). A derivação desta equação foi demonstrada na seção anterior e nesta seção o parâmetro IC_{50} é usado ao invés do HC_{50} .

$$IC_{50} = \left[\frac{(V_m \cdot c_c)^{-1} + K_{M/W}}{(V_m \cdot c_c)^{-1} + 1} \right] c_{w50}. \quad (35)$$

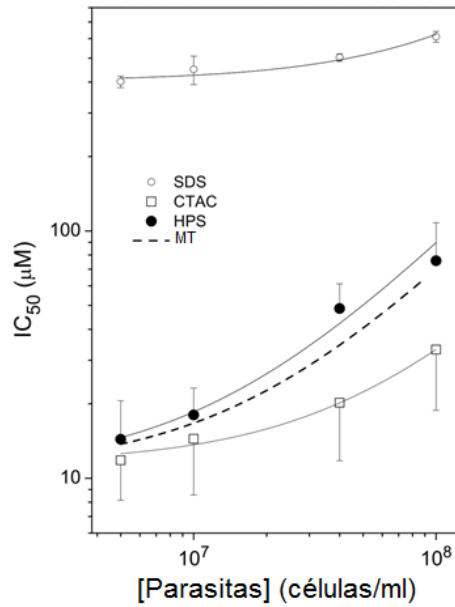


Figura 33. Valor de IC_{50} para os surfactants SDS, CTAC e HPS para as promastigotas da *Leishmania amazonensis* em comparativo com a MT. As curvas de melhor ajuste aos pontos experimentais foram determinadas pela Eq. (34) com os parâmetros variáveis $K_{M/W}$ e c_{w50} .

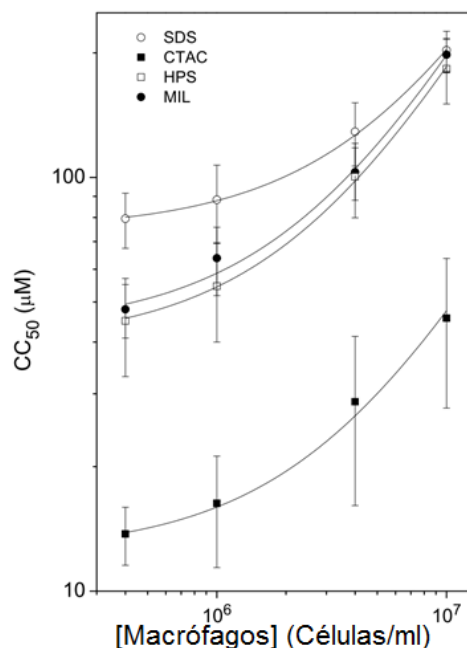


Figura 34. Valores de CC_{50} para os surfactantes SDS, CTAC e HPS em comparação com a MT em macrófagos. As curvas de melhor ajuste foram obtidas usando a Eq. (34).

Os parâmetros $K_{M/W}$, c_{m50} e c_{w50} obtidos das curvas mostradas nas Figuras. 32 e 33 são apresentados na Tabela 3. O SDS apresentou a menor afinidade para *L. amazonensis* e também para as membranas de macrófagos, tendo os valores de $K_{M/W}$ mais baixos. Também foi o composto que necessitou maiores concentrações na membrana para causar ruptura das células, como mostrado pelos valores de c_{m50} . Os dados da Tabela 3 também indicaram um desempenho semelhante para MT e HPS na interação com as membranas plasmáticas dos três tipos celulares usados neste estudo.

Nos experimentos mostrados na Figura 32, a concentração de 1×10^9 moléculas/célula corresponde a 3,3 mM, e com concentração celular utilizada elevada (2×10^9 células/mL). Esta condição é necessária para os experimentos de RPE, uma vez que as amostras no capilar têm um volume máximo de 50 μ L e pelo menos 1×10^8 células são necessárias para obter um bom sinal. Os espectros de RPE para altas concentrações de MT e surfactantes permitiram observar as grandes alterações que esses compostos podem causar na membrana do parasita. Como já descrito anteriormente [73], usando uma alta concentração de células (2×10^9 células/mL) o IC_{50} da MT em promastigotas de *L. amazonensis* foi de aproximadamente 1,1 mM, onde o espectro de RPE mostrou uma mudança significativa na membrana celular nesta concentração de MT. No entanto, como descrito anteriormente, os espectros RPE do 5-DSA não detectam alterações na membrana do eritrócito na concentração de MT que causa 50% de hemólise (HC_{50}). Para 18% hematócrito ($\sim 2 \times 10^9$ células/mL), $\sim 1,1$ mM MT foi necessário para

observar mudanças significativas na mobilidade da sonda, mas para esta concentração celular, o HC_{50} MT foi de apenas 260 μ M em PBS [69]. Esses dados são consistentes com os valores de c_{m50} mostrados na Tabela 1 para o eritrócito ($c_{m50} = 0,1$ M) e na Tabela 3 para a leishmânia ($c_{m50} = 0,7$ M), onde parece indicar que o efeito hemolítico da MT na membrana eritrocitária é uma alteração bem localizada, em contraste com o caso do parasita, em que as alterações da membrana parecem ser amplas e difusas o suficiente para serem detectadas na espectroscopia de RPE. De acordo com essa interpretação, a MT teria a capacidade de interagir com muitos locais das proteínas da membrana do parasita e, portanto, uma maior concentração seria necessária para causar danos na membrana; em contrapartida, nos eritrócitos a MT se acumularia em certas regiões protéicas, causando danos mais localizados e concentrações mais baixas seriam suficientes para causar hemólise. Como mostrado na Figura 30, surfactantes iônicos e MT (zwitteriônicos) interagem fortemente com as proteínas da membrana, e como já citado, sabe-se que esse tipo de interação é favorecido por cargas moleculares. Assim, o grupo polar da molécula MT, onde as cargas elétricas estão presentes, deve ser responsável pela interação com as proteínas, enquanto que a cadeia hidrofóbica deve interagir com os lipídios da membrana e assim modular a interação com as proteínas. Com isto, pode ser possível obter análogos de MT com a capacidade de causar dano mais localizado na membrana. Talvez a adição de grupos hidrofóbicos, como anéis aromáticos no final da cadeia lipídica pode favorecer o acúmulo do fármaco em determinados pontos da interface proteína-lipídio.

Embora a espectroscopia de RPE seja uma técnica de notável sensibilidade e reprodutibilidade para avaliar a dinâmica molecular na membrana celular, tanto nos componentes lipídicos como proteicos, não é sensível o suficiente para detectar mudanças localizadas na membrana. Como uma técnica que usa uma sonda de spin com uma razão molecular de menos de um para cada 120 moléculas lipídicas não marcadas, as sondas tornam-se espaçadas na membrana e, conseqüentemente, mudanças na membrana são detectadas pelo sinal RPE somente quando uma considerável fração das sondas é afetada. Assim, vazamentos de eletrólitos ou lise celular são eventos que podem ser detectados em concentrações mais baixas de agentes danosos à célula.

Tabela 3. Parâmetros biofísicos associados com as interações dos surfactantes e MT com a membrana plasmática das promastigotas de *L. amazonensis* e Macrófagos J774.A1.

Cells	$K_{M/W} (10^4)^a$	$\log K_{M/W}$	$c_{w50} (\mu M)$	$c_{m50} (M)$
<i>L. amazonensis</i>				
SDS	$0,66 \pm 0,11 (A)^b$	3,82	$404,3 \pm 14,3 (A)$	$2,67 \pm 0,46 (A)$
CTAC	$2,47 \pm 0,31 (B)$	4,39	$11,1 \pm 0,6 (B)$	$0,27 \pm 0,04 (B)$
HPS	$8,10 \pm 1,20 (C)$	4,91	$10,6 \pm 2,3 (B)$	$0,86 \pm 0,32 (C)$
MT	$6,78 \pm 0,26 (C)$	4,83	$10,8 \pm 3,0 (B)$	$0,73 \pm 0,29 (C)$
Macrófagos J774.A1				
SDS	$2,58 \pm 0,07 (A)$	4,41	$75,0 \pm 1,0 (A)$	$1,94 \pm 0,06 (A)$
CTAC	$4,24 \pm 0,39 (B)$	4,63	$12,4 \pm 0,4 (B)$	$0,53 \pm 0,05 (B)$
HPS	$5,48 \pm 0,24 (C)$	4,74	$39,8 \pm 1,1 (C)$	$2,18 \pm 0,11 (C)$
MT	$5,35 \pm 0,46 (C)$	4,73	$43,2 \pm 2,2 (C)$	$2,31 \pm 0,23 (C)$

^a Valores obtidos do plote da Eq.(34) apresentada na Figura 32, onde $K_{M/W}$ é o coeficiente de partição, o c_{w50} e c_{m50} são as concentrações moleculares no meio aquoso e na membrana, respectivamente, as quais causam 50% de hemólise.

^b Significância estatística: em cada coluna, os dados indicados com letras distintas são significativamente diferentes com $P < 0,05$.

É geralmente aceito que a MT tem propriedades detergentes e pode causar lise celular em concentrações mais altas; mas em concentrações clinicamente relevantes, assume-se que a MT pode causar interferência na renovação de fosfolipídios e vias de transdução de sinal baseadas em lipídeos que poderia iniciar a situação apoptótica [86]. No entanto, ensaios *in vitro* indicam que a MT inibe o crescimento de parasitas apenas em níveis relativamente altos de concentrações. Por exemplo, um IC_{50} da MT de aproximadamente $14,4 \mu M$ em promastigotas de *L. amazonensis* foi observado no ensaio com 6×10^6 células/mL (Figura 31); esta concentração corresponde a $1,44 \times 10^9$ moléculas/célula. Por outro lado, para ensaios com concentrações celulares maiores, como 2×10^9 células/mL (no sangue, há 5×10^9 células/mL), o IC_{50} da MT sobe para $1,2 \text{ mM}$ (eq.34), o que corresponde a $0,36 \times 10^9$ moléculas/célula. Experimentos usando esta última concentração de células (2×10^9 células/mL) mostraram pelo menos 5% de lise celular em amostras tratadas com MT a $0,44 \times 10^9$ moléculas/célula [87].

É importante mencionar que a espectroscopia de RPE não detectou diferenças na interação da MT com as formas promastigota e amastigota de *L. amazonensis*. Além disso, os

valores de c_{w50} para as duas formas não foram significativamente diferentes. No entanto a MT demonstrou maior afinidade pela membrana da amastigota (c_{m50} muito maior que a do promastigota) [73]. Os resultados são consistentes com o acúmulo dos compostos estudados na membrana parasitária. Por exemplo, quando a MT é adicionada a uma suspensão de promastigotas de *L. amazonensis*, seu IC_{50} observado será dado pela distribuição da molécula na fase aquosa da suspensão $10.8 \mu\text{M}$ (c_{w50}) e $0,73\text{M}$ (c_{m50}) para qualquer concentração de células utilizada.

A resistência da Leishmania a MT tem sido associada com a diminuição da internalização do fármaco devido a um aumento em seu fluxo mediado pela superexpressão do transportador ABC P-glicoproteína ou inativação de qualquer uma das duas proteínas responsáveis pela captação da MT, o transportador de MT LdMT e sua subunidade beta LdRos3 [88]. Acreditamos que a flippase dependente do complexo LdMT-LdRos3 potencializa a atividade de MT contra parasitas da Leishmania, não porque favorece a internalização da droga, mas porque promove uma distribuição rápida do fármaco nas duas monocamadas da membrana plasmática [73]. Da mesma forma, a superexpressão dos transportadores ABC atuando como as flippases da MT poderiam retardar esse processo, reduzindo assim a ação da MT na membrana parasita.

O SDS também causou pequenos aumentos na dinâmica das proteínas de membrana de Leishmania em comparação com os outros surfactantes e a MT (Figura 32A). Este resultado está de acordo com o fato de o SDS ter sido o composto que apresentou maior c_{m50} em Leishmania e eritrócitos do que os outros compostos. Os valores de $K_{M/W}$ mostrados na Tabela 3 indicaram que as afinidades dos detergentes iônicos para as membranas celulares estudadas seguem uma relação que parece estar associada com a carga elétrica do composto. Os compostos zwitteriônicos, HPS e MT, apresentaram os maiores valores de $K_{M/W}$, o composto aniônico SDS, teve o menor $K_{M/W}$ e o catiônico CTAC apresentou valores intermediários de $K_{M/W}$ para *Leishmania amazonensis* e macrófagos J774.A1. A superfície celular de eritrócitos tem uma carga negativa que ocorre devido à presença do grupo carboxila dos ácidos siálicos na membrana celular [81]. Já as promastigotas e amastigotas de algumas espécies de Leishmania também têm carga superficial negativa, detectada por partículas catiônicas [89,90]. As interações de carga elétrica poderiam explicar a menor afinidade do SDS em relação ao CTAC e sugerem que os compostos zwitteriônicos se acumulariam mais facilmente na membrana porque eles têm uma carga total neutra.

Todos os três surfactantes foram capazes de reduzir o crescimento e quantidade de parasitas nos macrófagos após 24 h de tratamento (Figura 35). No interior dos macrófagos, os dados demonstraram que os surfactantes são capazes de eliminar a *L. amazonensis*. Para os macrófagos J774.A1, a MT apresentou c_{w50} no valor de $43,2 \pm 2,2 \mu\text{M}$, sendo muito inferior ao valor relatado de $132 \pm 8 \mu\text{M}$ encontrado para macrófagos peritoneais obtidos de camundongos BALB/c [63]. Assim, usando J774.A1 macrófagos, o índice de seletividade ($SI = CC_{50}/IC_{50}$) entre células de *Leishmania* e macrófagos apresentou baixo valor e a redução na porcentagem de células GFP+ parece ocorrer em concentrações de MT que já são citotóxicas para os macrófagos.

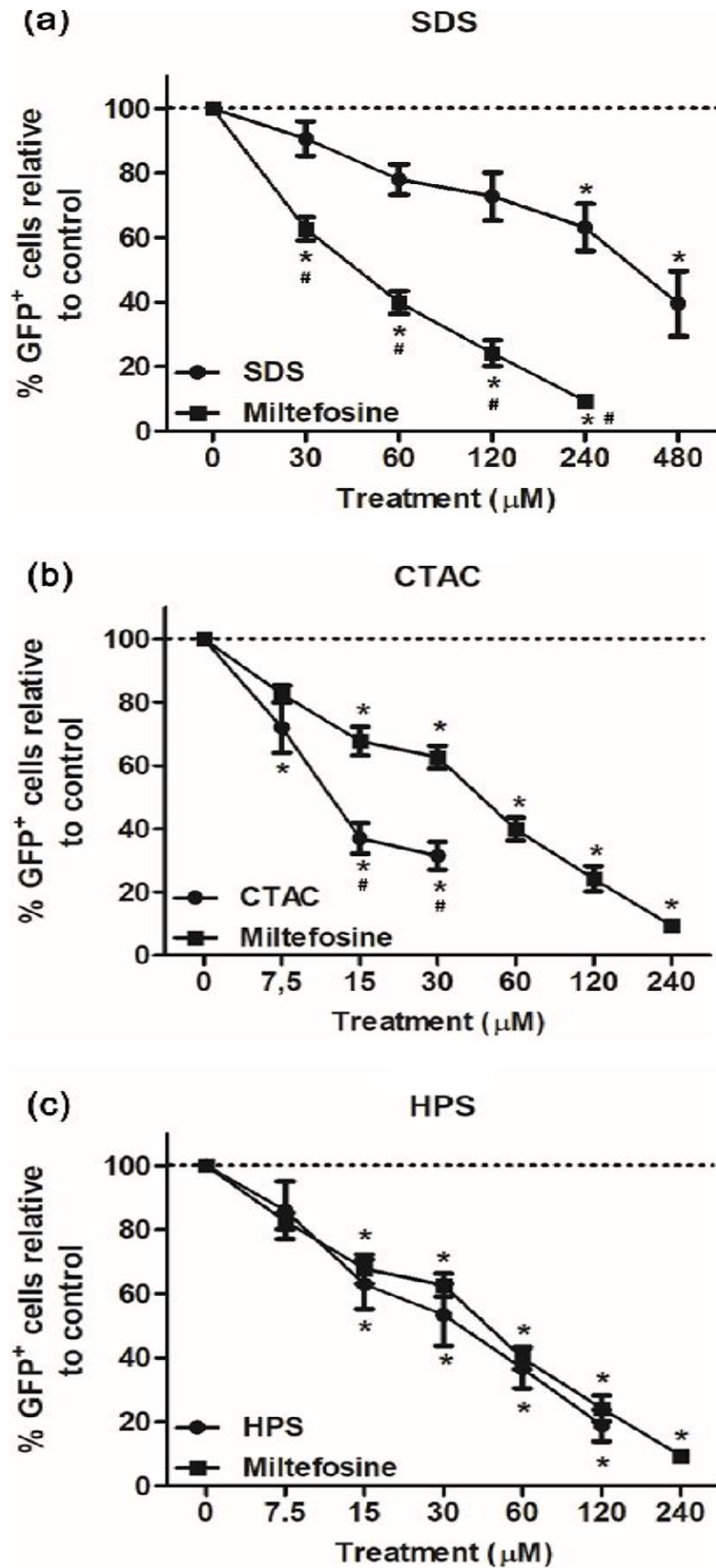


Figura 35. Ação leishmanicida dos surfactantes SDS, CTAC e HPS sobre macrófagos J774.A1 infectados com *L. amazonensis*. Miltefosina (MT) foi usada como controle positivo. Significância estatística: * $p < 0,05$, comparado ao controle; # $p < 0,05$, surfactante versus MT, em cada concentração. Retirado de [104].

6. CONCLUSÕES

Com relação aos eritrócitos, os espectros de RPE para sondas lipídicas e proteicas indicaram que os surfactantes SDS, CTAC e HPS assim como a MT, aumentam a dinâmica das proteínas da membrana eritrocitária de acordo com a concentração destes na membrana. Adicionalmente, o 5-DSA indicou que a concentração de SDS necessária para produzir o mesmo efeito é mais de três vezes maior que das demais moléculas. Além disso, o 5-DSA, uma sonda de spin que tem a propriedade de ligação em vários locais da albumina, mostrou que para uma concentração de 2,5mM no plasma sanguíneo, o SDS causa uma grande redução na dinâmica da albumina, enquanto o CTAC aumenta a dinâmica e a MT e o HPS não causam alterações. No entanto, a 10 mM, todos os compostos aumentaram a dinâmica molecular da albumina. A concentração na membrana para causar 50% de hemólise foi muito maior para SDS ($c_{m50} = 480$ mM) do que para os outros compostos (c_{m50} variou de 110 para 170 mM). Em todos os experimentos deste estudo, não houve diferenças significativas entre HPS e MT, enquanto diferentes comportamentos entre MT e CTAC foram observadas apenas para a interação com a albumina. Assim, os dados do RPE sobre dinâmica molecular da membrana mostraram uma correlação com os potenciais hemolíticos das substâncias. O SDS produziu o menor aumento na mobilidade das proteínas da membrana eritrocitária e o menor efeito hemolítico, ao passo que os outros três compostos foram equivalentes em suas alterações dos espectros de RPE e em seus efeitos hemolíticos.

Com relação aos parasitas e macrófagos J774.A1, também foram determinados os três parâmetros biofísicos resultantes das interações da MT e dos três surfactantes iônicos com as membranas plasmáticas. Em comparação com os outros compostos, como no caso dos eritrócitos e albumina, o SDS foi novamente o menos agressivo nas membranas, apresentando o maior valor de c_{w50} . Este resultado pode ser explicado pela menor afinidade do SDS por essas membranas (menor valores de $K_{M/W}$) e efeitos menos localizados do que os outros compostos (com valores de c_{m50} mais baixos). A menor afinidade do SDS em relação aos outros compostos pode ser explicada pelo fato de que essas células têm cargas de superfície negativas, e o SDS é aniônico. O SDS também foi o composto que exigiu maiores concentrações para aumentar a dinâmica molecular das proteínas da membrana de Leishmania. O CTAC foi o mais agressivo para Leishmania e membranas dos macrófagos, sugerindo efeitos mais localizados na membrana (valores c_{m50} mais baixos) do que dos demais compostos, possivelmente devido ao acúmulo de cargas positivas em locais específicos da

membrana. Para todos os experimentos, os resultados dos compostos zwitteriônicos HPS e MT não mostraram diferença significativa.

Esta análise comparativa da MT com surfactantes iônicos contribui para uma melhor compreensão do mecanismo de ação de suas atividades nos parasitas de Leishmania. Isso sugere que a principal ação da MT é sobre as proteínas de membrana do parasita, na qual tem a capacidade de se acumular, ocasionando a desnaturação das proteínas e, como consequência, o comprometimento das funções da membrana celular, tal como a de manter o equilíbrio iônico.

Este trabalho também sugere a possibilidade de se usar surfactantes catiônicos ou zwitteriônicos em formulações contendo leishmanicidas, visando o tratamento da leishmaniose cutânea.

7. PERSPECTIVAS

Dos resultados obtidos neste trabalho, utilizar a metodologia desenvolvida para estudo das interações dos surfactantes iônicos SDS, CTAC e HPS e miltefosina em outros tipos de micro-organismos e células, com o intuito de elucidar completamente o mecanismo de ação destes compostos e com isso aprimorar futuras formulações da MT buscando reduzir o efeito colateral deste fármaco e criar novas formulações de medicamentos no combate a enfermidades causadas à pele tendo os surfactantes como base.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] World Health Organization. 2022 <https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>
[Acesso em: 09/05/2022].
- [2] AZULAY, R.D., 1952. **Leishmaniose tegumentar**. Tese para Livre Docente. Rio de Janeiro.
- [3] ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE (OPAS). **Leishmanioses** Informe epidemiológico das América Número 10
- [4] TAVARES, KASSIO SAMAY RIBEIRO; OLIVEIRA, IARA BARRETO NEVES; SILVA, CARLOS EDUARDO FÉLIX DA; MOURA, ALDENIRA MATIAS DE; SILVA, MURIEL VILELA TEODORO; MENDES, SAMUEL DE OLIVEIRA; BARROS-SILVEIRA, MURILO. **Perfil epidemiológico e análise da distribuição espacial dos casos de leishmaniose tegumentar americana no estado de Goiás**. Diversistas Journal, vol 7, no 1, pp 228-237, 2022.
- [5] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2ª edição. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007.
- [6] GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. 6ª edição. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, pp 444-445, 2005.
- [7] FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 5ª edição. Brasília: FUNASA, 2, pp. 503-524, 2002.
- [8] B. GONTIJO and M. L. R. DE CARVALHO, **Leishmaniose Tegumentar Americana**, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, vol. 36, no. 1, pp. 71–80, 2003.

- [9] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana**: Diagnóstico Clínico e Diferencial. 1ª edição. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.
- [10] MANUAL DE VIGILÂNCIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA. 2ª Edição. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010.
- [11] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana**: Diagnóstico Clínico e Diferencial. 1ª edição. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.
- [12] FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 5ª edição. Brasília: FUNASA, 2, pp. 503-524, 2002.
- [13] FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 5ª edição. Brasília: FUNASA, 2, pp. 503-524, 2002.
- [14] S. SINGH and R. SIVAKUMAR, Challenges and New Discoveries in the Treatment of Leishmaniasis, **J. Infect. Chemother.**, vol. 10, no. 6, pp. 307–315, 2004.
- [15] J. D. BERMAN, Human Leishmaniasis: Clinical, Diagnostic, and Chemotherapeutic Developments in the Last 10 Years., **Clin. Infect. Dis.**, vol.24, no. 4, pp. 684–703, 1997.
- [16] M. OUELLETTE, J. DRUMMELSMITH, and B. PAPADOPOULOU, Leishmaniasis: Drugs in the Clinic, Resistance and New Developments, **Drug Resist. Updat.**, vol. 7, no. 4–5, pp. 257–266, 2004.
- [17] J. SOTO, J. TOLEDO, P. GUTIERREZ, R. S. NICHOLLS, J. PADILLA, J. ENGEL, C. FISCHER, A. VOSS, and J. BERMAN, Treatment of American Cutaneous Leishmaniasis with Miltefosine, an Oral Agent., **Clin. Infect. Dis.**, vol. 33, no. 5, pp. E57–E61, 2001.

- [18] MANN, RAJINDER S., KAUFMAN, PHILIP E. and BUTLER JERRY F. A SAND FLY, *Lutzomyia shannoni* Dyar (Insecta: Diptera: Psychodidae: Phlebotomine. **University of Florida IFAS Extension.** p. 2-3. 2014
- [19] YOUNG, D.G.; DUNCAN, M.A. (1994) Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera, Psychodidae). **Memories of the American Entomological Institute.** n. 54, p.871-881
- [20] BATES, P.A. (2007) Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand fly. **International Journal for Parasitology.** n. 37, p. 1097-1106.
- [21] RANGEL, E.F.; SOUZA, N.A.; WERMELINGER, E.D.; BARBOSA, A.F.; ANDRADE, C.A. (1986) Biology of *Lutzomyia intermedia* Lutz and Neiva, 1912 and *Lutzomyia longipalpis* Lutz and Neiva, 1912 (Diptera, Psychodidae), under experimental conditions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** n. 81, p.431-438.
- [22] RIBEIRO, J.M. (1987a) Role of saliva in blood-feeding by arthropods. **Annual Review of Entomology.** n. 32, p. 463-478.
- [23] PIMENTA, P.F.P., SARAIVA, E.M.B., SACKS, .S.L., 1991. The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*. **Exp Parasitol.** 72(2): 191-204.
- [24] PIMENTA, PAULO FILEMON PAOLUCCI; FREITAS, VANESSA CABREIRA DE; SECUNDINO, NÁGILA FRANCINETE COSTA. **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular INCT.** cap.12. p.9. 2012.
- [25] LAWYER, P.G., NGUMBI, P.M., ANJILI, C.O., ODONGO, S.O., MEBRAHTU, Y.B., GITHURE, J.I., KOECH, D.K., ROBERTS, C.R., 1990. Development of *Leishmania major* in *Phlebotomus duboscqi* and *Sergentomyia schwetzi* (Diptera: Psychodidae). **Am J Trop Med Hyg.** 43(1), 31-43.

- [26] PIMENTA, P.F.P., TURCO, S.J., MCCONVILLE, M., LAWYER, P.G., PERKINS, P.V., SACKS, D. 1992. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to sand fly midgut. **Science**. 256, 1812-1815.
- [27] S. J. SINGER and G. L. NICOLSON, The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. **Science**, vol. 175, pp. 720-731, 1972.
- [28] P. SCHNEIDER, C. BORDIER, and R. ETGES, Membrane Proteins and Enzymes of *Leishmania*., **Subcell. Biochem.**, vol. 18, pp. 39–72, 1992.
- [29] MENSA-WILMOT K., GARG N., MCGWIRE B.S., LU H.G., ZHONG L., ARMAH D.A., LEBOWITZ J.H. & CHANG K.P. (1999) Roles of free GPIs in amastigotes of *Leishmania*. **Mol.Biochem.Parasitol**. 99, 103-116.
- [30] ASSIS, R. R.; IBRAIM, I. C.; NOGUEIRA, P. M.; SOARES, R. P.; TURCO, S. J. Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. **Biochim Biophys Acta**, Sep;1820:1354-65, 2012a.
- [31] DESCOTEAUX, A. & TURCO, S. J. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. **Biochim Biophys Acta**; 1455: 341–352, 1999
- [32] MALCOLM J.MCCONVILLEL; SALVATORE J.TURCO; MICHAEL A.J.FERGUSON and DAVID L.SACKS. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage.
- [33] MCCONVILLE, M. J.; TURCO, S. J.; FERGUSON, M. A. J.; SACKS, D. L. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. **Eur Mol Biol Organ J**, 11: 3593-3600, 1992.

- [34] SARAIVA, E.M., PIMENTA, P.F., BRODIN, T.N., ROWTON, E., MODI, G.B., SACKS, D.L., 1995. Changes in lipophosphoglycan and gene expression associated with the development of *Leishmania major* on *Phelebotomus papatasi*. **Parasitology**. 111(Pt3), 275-287.
- [35] APPELBERG, R. (2005). As células Fagocíticas. In C. Avevedo. **Biologia Celular e molecular**. Lisboa, LIDEL:pp. 491-502.
- [36] TAKEDA, K. E AKIRA, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. **International Immunology**, 17, pp. 1-14.
- [37] ELOMAA, O.; SANKALA, M.; PIKKARAINEN, T., et al. (1998). Structure of the Human Macrophage MARCO Receptor and Characterization of Its Bacteria-binding Region. **The journal of biological chemistry** 273, pp. 4530-4538
- [38] Macrophage cell ENCYCLOPÆDIA BRITANNICA
www.britannica.com/science/macrophage/media/355443/138573
- [39] M. C. DE ALMEIDA, V. VILHENA, A. BARRAL, and M. BARRAL-NETTO, "Leishmanial Infection: Analysis of its First Steps. A Review," **Mem. Inst.Oswaldo Cruz**, vol. 98, no. 7, pp. 861–870, 2003.
- [40] ARANGO-DUQUE, G. e DESCOTAUX, A. (2015). Leshmania survival in the macrophages: where the ends justify the means. curropin **Microbiology**, 26, pp. 32-40.
- [41] TEIXEIRA DE, BENCHIMOL M, RODRIGUES JCF, CREPALDI PH, PIMENTA PFP, et al.(2013) The Cell Biology of Leishmania: How to Teach Using Animations. **PLoS Pathog** 9(10): e1003594. doi:10.1371/journal.ppat.1003594
- [42] <http://www.ib.usp.br/microgene/files/biblioteca-22-PDF.pdf>
- [43] DALTIM, DECIO. **Tensoativos: Química, propriedades e aplicações**. São Paulo: Blucher, 2011. pp. 11-17.

- [44] AZEVEDO, BEATRIZ RIBEIRO SOUZA DE; GRAMATGES, AURORA PÉREZ. Estabilidade de espumas líquidas de soluções de surfactantes: efeito de misturas e adição de nanopartículas. **Revista Brasileira de Iniciação Científica**, Itapetininga, v. 3, n. 7, pp. 58, 2016
- [45] UNGER, C.; DAMENZ, W.; FLEER, E.A.; KIM, D.J.; BREISER, A.; HILGARD, P.; ENGEL, J.; NAGEL, G EIBL, H. Hexadecylphosphocoline, a new ether-lipid analog. Studies on the antineoplastic activity *in vitro* and *in vivo*. **Acta Oncol.**, v. 28, p. 213-217, 1989
- [46] SINDERMANN, H.; CROFT, S.L.; ENGEL, K.R.; BOMMER, W.; EIBL, H.J.; UNGER, C.; ENGEL, J. Miltefosine (Impavido): the first oral treatment against leishmaniasis. **Med. Microbiol. Immunol.**, in press, 2003
- [47] S.L. CROFT, K. SEIFERT, M. DUCHÊNE, Antiprotozoal activities of phospholipid analogues, **Mol. Biochem. Parasitol.** 126, 165–172, 2003. Doi: 10.1016/S0166 6851(02)00283-9
- [48] D. LLULL, L. RIVAS, E. GARCÍA, In vitro bactericidal activity of the antiprotozoal drug miltefosine against *Streptococcus pneumoniae* and other pathogenic streptococci. **Antimicrob. Agents Chemother.** 51, 1844–1848, 2007. Doi: 10.1128/AAC.01428-06
- [49] F. WIDMER, L.C. WRIGHT, D. OBANDO, R. HANDKE, R. GANENDREN, D.H. ELLIS, T.C. SORRELL, Hexadecylphosphocholine (miltefosine) has broad-spectrum fungicidal activity and is efficacious in a mouse model of cryptococcosis, **Antimicrob. Agents Chemother.** 50 (2006) 414–421. Doi:10.1128/AAC.50.2.414-421.2006.
- [50] D. A. SKOOG, F. J. HOLLER, S. R. CROUCH, *Principles of Instrumental Analysis*, 6a edição. **Belmont:** Thomson Brooks/Cole, 2007

- [51] D. A. SKOOG, D. M. WEST, F. J. HOLLER, S. R. CROUCH, **Fundamentos De Química Analítica**, 8ª edição. São Paulo: Thomson, 2006
- [52] D. L. PAVIA, G.M. LAMPMAN, G. S. KRIZ, and J. R. VYVYAN, Introduction to Spectroscopy, 4a edição. **Belmont**: Brooks/Cole, Cengage Learning, 2009
- [53] D. A. SKOOG, D. M. WEST, F. J. HOLLER, S. R. CROUCH, **Fundamentos De Química Analítica**, 8ª edição. São Paulo: Thomson, 2006
- [54] A. ABRAGAM AND B. BLEANEY, **Electron Paramagnetic Resonance of Transition Ions**, 1ª edição. Oxford: Clarendon Press, 1970.
- [55] COMMONERB, TOWNSENDJ, PAKE, G . E., **Nature, Lond.**, 174, 689, 1954
- [56] SWARTZ, H.M.; BOLTON, J.R e BORG, D.C. (editores) 1972. **Biological Application of electron spin ressonance**. Wiley-Interscience, John Wily & Sons, Inc., New York
- [57] W. R. HAGEN, **Biomolecular EPR Spectroscopy**. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2009
- [58] SWARTZ, H. M.; BOLTON, J. R.; BORGCULLITY, D. C. **Biological Applications of Electron Spin Resonance**. United States of America: John Wile & Sons, 1972. 1-116 p.
- [59] ATKINS, P.; PAULA, J. *ATKIN*, **Físico-Química**. 8º. ed. Rio de Janeiro, RJ: LTC Editora, 2008. 467-503 p.
- [60] BRUSTOLON M. G. E.; (2009) **Electron Paramagnetic Resonance A Practitioner's Toolkit**, New Jersey, 16–17.
- [61] PERUSSI, J. R.; RUGGIERO, A. C.; TABAK, M. *O método de marcadores de spin aplicado a bioquímica*. **Química Nova**, p. 313–324, 1985

- [62] ATKINS; PAULA, 2008; SWARTZ; BOLTON; BORGCULLITY, 1972
- [63] MCCONNELL, H. M.; OHNISHI, S. J. *Interaction of the radical ion of chlorpromazine with dna*. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 87, n. 2293, p. 26, 1965.
- [64] H. M. SWARTZ, J. R. BOLTON, and D. C. BORG, **Biological Applications of Electron Spin Resonance**, 1a edição. New York: John Wiley & Sons, 1972
- [65] NORDIO, P. L. General magnetic resonance theory. In: BERLINER, L. J. (Ed.). *Lipid spin labels in biological membranes*. New York: **Academic Press**, 1976, (II, v. 6o). cap. 1, p. 7.
- [66] H. M. SWARTZ, J. R. BOLTON, and D. C. BORG, *Biological Applications of Electron Spin Resonance*, 1a edição. New York: **John Wiley & Sons**, 1972
- [67] D. A. SKOOG, F. J. HOLLER, S. R. CROUCH, **Principles of Instrumental Analysis**, 6a edição. Belmont: Thomson Brooks/Cole, 2007
- [68] <https://www.quimigen.com/en/mtt-assays-3984/mtt-celullar-viability-assay-kit-443000023.html>
- [69] A. M. SIEUWERTS, J. G. KLIJN, H. A. PETERS, and J. A. FOEKENS, The MTT Tetrazolium Salt Assay Scrutinized: How to Use this Assay Reliably to Measure Metabolic Activity of Cell Cultures in Vitro for the Assessment of Growth Characteristics, IC50-Values and Cell Survival., *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, vol. 33, no. 11, pp. 813–823, 1995.
- [70] P.C. JOST, O.H. GRIFFITH, R.A. CAPALDI, G. VANDERKOOI, Evidence for boundary lipid inmembranes, **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 70 (1973) 480–484, <https://doi.org/10.1073/pnas.70.2.480>.

- [71] D. MARSH, Electron spin resonance in membrane research: protein-lipid interactions from challenging beginnings to state of the art, **Eur. Biophys. J.** 39 (2010) 513–525, <https://doi.org/10.1007/s00249-009-0512-3>.
- [72] L. ALONSO, S.A. MENDANHA, C.A. MARQUEZIN, M. BERARDI, A.S. ITO, A.U. ACUÑA, A. ALONSO, Interaction of miltefosine with intercellular membranes of stratum corneum and biomimetic lipid vesicles, **Int. J. Pharm.** 434 (2012) 391–398, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.006>.
- [73] K.S. FERNANDES, P.E. DE SOUZA, M.L. DORTA, A. ALONSO, The cytotoxic activity of miltefosine against Leishmania and macrophages is associated with dynamics changes in plasma membrane proteins, **Biochim. Biophys. Acta** 1859 (1) (2017) 1–9, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.10.008>.
- [74] J.L. ANJOS, P.S. SANTIAGO, M. TABAK, A. ALONSO, On the interaction of bovine sérum albumin with ionic surfactants: temperature induced EPR changes of a maleimide nitroxide reflect local protein dynamics and probe solvent accessibility, **Colloids Surf. B Biointerfaces** 88 (1) (2011) 463–470, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.07.030>.
- [75] A. ALONSO, W.P. DOS SANTOS, S.J. LEONOR, J.G. DOS SANTOS, M. TABAK, Stratum corneum protein dynamics as evaluated by a spin-label maleimide derivative: effect of urea, **Biophys. J.** 81 (6) (2001) 3566–3576, [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)75987-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)75987-5)
- [76] R.A. MOREIRA, S.A. MENDANHA, D. HANSEN, A. ALONSO, Interaction of miltefosine with the lipid and protein components of the erythrocyte membrane, **J. Pharm. Sci.** 102 (5) (2013) 1661–1669, <https://doi.org/10.1002/jps.23496>
- [77] C.F. BREWER, J.P. RIEHM, Evidence for possible nonspecific reactions between Nethylmaleimide and proteins, **Anal. Biochem.** 18 (2) (1967) 248–255, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(67\)90007-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(67)90007-3).

- [78] E.L. GELAMO, R. ITRI, A. ALONSO, J.V. DA SILVA, M. TABAK, Small-angle X-ray scattering and electron paramagnetic resonance study of the interaction of bovine serum albumin with ionic surfactants, **J. Colloid Interface Sci.** 277 (2) (2004) 471–482, <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.04.065>.
- [79] L. ALONSO, A. ALONSO, Hemolytic potential of miltefosine is dependent on cell concentration: implications for in vitro cell cytotoxicity assays and pharmacokinetic data, **Biochim. Biophys. Acta** 1858 (2016) 1160–1164, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.03.004>
- [80] S.F. SANTOS, D. ZANETTE, H. FISCHER, R. ITRI, A systematic study of bovine serum albumin (BSA) and sodium dodecyl sulfate (SDS) interactions by surface tension and small angle X-ray scattering, **J. Colloid Interface Sci.** 262 (2) (2003) 400–408, [https://doi.org/10.1016/S0021-9797\(03\)00109-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9797(03)00109-7)
- [81] H.P. FERNANDES, C.L. CESAR, MDE L. BARJAS-CASTRO, Electrical properties of the red blood cell membrane and immunohematological investigation, **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** 33 (4) (2011) 297–301, <https://doi.org/10.5581/1516-8484.20110080>.
- [82] P.C. JOST, O.H. GRIFFITH, R.A. CAPALDI, G. VANDERKOOI, Evidence for boundary lipid in membranes, **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 70 (1973) 480–484, <https://doi.org/10.1073/pnas.70.2.480>.
- [83] D. MARSH, Electron spin resonance in membrane research: protein-lipid interactions from challenging beginnings to state of the art, **Eur. Biophys. J.** 39 (2010) 513–525, <https://doi.org/10.1007/s00249-009-0512-3>.
- [84] L. ALONSO, S.A. MENDANHA, C.A. MARQUEZIN, M. BERARDI, A.S. ITO, A.U. ACUÑA, A. ALONSO, Interaction of miltefosine with intercellular membranes of stratum corneum and biomimetic lipid vesicles, **Int. J. Pharm.** 434 (2012) 391–398, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.006>.

- [85] A. ALONSO, J. VASQUES DA SILVA, M. TABAK, Hydration effects on the protein dynamics in stratum corneum as evaluated by EPR spectroscopy, **Biochim. Biophys. Acta** 1646 (2003) 32–41, [https://doi.org/10.1016/S1570-9639\(02\)00545-9](https://doi.org/10.1016/S1570-9639(02)00545-9).
- [86] W.J. VAN BLITTERSWIJK, M. VERHEIJ, Anticancer alkylphospholipids: mechanisms of action, cellular sensitivity and resistance, and clinical prospects, **Curr. Pharm. Des.** 14 (21) (2008) 2061–2074
- [87] R.A. MOREIRA, S.A. MENDANHA, K.S. FERNANDES, G.G. MATOS, L. ALONSO, M.L. DORTA, A. ALONSO, Miltefosine increases lipid and protein dynamics in *Leishmania amazonensis* membranes at concentrations similar to those needed for cytotoxicity activity, **Antimicrob. Agents Chemother.** 58 (2014) 3021–3028, <https://doi.org/10.1128/AAC.01332-13>.
- [88] F.J. PÉREZ-VICTORIA, M.P. SÁNCHEZ-CAÑETE, K. SEIFERT, S.L. CROFT, S. SUNDAR, S. CASTANYS, F. GAMARRO, Mechanisms of experimental resistance of leishmania to miltefosine: implications for clinical use, **Drug Resist. Updat.** 9 (2006) 26–39, <https://doi.org/10.1016/j.drug.2006.04.001>.
- [89] P.F. PIMENTA, W. DE SOUZA, *Leishmania mexicana amazonensis*: surface charge of amastigote and promastigote forms, **Exp. Parasitol.** 56 (2) (1983) 194–206.
- [90] T. SOUTO-PADRÓN, The surface charge of trypanosomatids, **An. Acad. Bras. Cienc.** 74 (4) (2002) 649–675.
- [91] M. Rakotomanga, M. Saint-Pierre-Chazalet, and P. M. Loiseau, Alteration of Fatty Acid and Sterol Metabolism in Miltefosine-Resistant *Leishmania donovani* Promastigotes and Consequences for Drug-Membrane Interactions, **Antimicrob. Agents Chemother.**, vol. 49, no. 7, pp. 2677–2686, 2005.

- [92] E. Palumbo, Oral Miltefosine Treatment in Children with Visceral Leishmaniasis: a Brief Review., **Braz. J. Infect. Dis.**, vol. 12, no. 1, pp. 2–4, 2008.
- [93] T. Wieder, W. Reutter, C. E. Orfanos, and C. C. Geilen, Mechanisms of Action of Phospholipid Analogs as Anticancer Compounds, **Prog. Lipid Res.**, vol. 38, no. 3, pp. 249–259, 1999.
- [94] D. Berkovic, J. H. Wernicke, and E. a M. Fler, Effects of Etherlipid Analogs on Cell Membrane Functions, **J. Exp. Ther. Oncol.**, vol. 3, no. 4, pp. 185–193, 2003.
- [95] H. Lux, N. Heise, T. Klenner, D. Hart, and F. R. Opperdoes, Ether-Lipid (Alkyl-phospholipid) Metabolism and the Mechanism of Action of Ether-lipid Analogues in Leishmania, **Mol. Biochem. Parasitol.**, vol. 111, no. 1, pp. 1–14, 2000.
- [96] F. J. Pérez-Victoria, S. Castanys, and F. Gamarro, *Leishmania donovani* Resistance to Miltefosine Involves a Defective Inward Translocation of the Drug, **Antimicrob. Agents Chemother.** vol. 47, no. 8, pp. 2397–2403, 2003.
- [97] F. J. Pérez-Victoria, M. P. Sánchez-Cañete, K. Seifert, S. L. Croft, S. Sundar, S. Castanys, and F. Gamarro, “Mechanisms of Experimental Resistance of Leishmania to Miltefosine: Implications for Clinical Use,” *Drug Resist. Updat.*, vol. 9, no. 1–2, pp. 26–39, 2006.
- [98] H. W. Murray, C. Montelibano, R. Peterson, and J. P. Sypek, Interleukin- 12 Regulates the Response to Chemotherapy in Experimental Visceral Leishmaniasis., **J. Infect. Dis.**, vol. 182, no. 5, pp. 1497–1502, 2000.
- [99] J. Berman, Miltefosine to Treat Leishmaniasis., **Expert Opin. Pharmacother.**, vol. 6, no. 8, pp. 1381–1388, 2005.

- [100] Côrte Real, M.; Sansonetty, F.; Ludovico, P.; Prudêncio, C.; Rodrigues, F.; Fortuna, M.; Sousa, M.; Silva, M.; Leão, C. Contributos da citologia analítica para estudos de biologia de leveduras. **Boletim de Biotecnologia**, 71: 19-33. 2002.
- [101] Fang, Y.; Ramasamy, R. P. Current and Prospective Methods for Plant Disease Detection. **Biosensors**, v. 4, p. 537-561, 2015.
- [102] <https://www.gratispng.com/png-im2ewi/>
- [103] Teva, A.; Fernandez, J. C. C.; Silva, V. L. Imunologia. In: Molinaro, E. M.; Caputo, L. F. G.; Amendoeira, M. R. R. (Eds.) **Conceitos e Métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**. 1 ed. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, p.1-124, 2009.
- [104] Alonso, Lais ; **Souza Cardoso, Éder Jeferson** ; Saar Gomes, Rodrigo ; Mendanha, Sebastião Antônio ; Dorta, Miriam Leandro ; Alonso, Antonio . Antileishmanial and cytotoxic activities of ionic surfactants compared to those of Miltefosine. **Colloids And Surfaces B-Biointerfaces**, v.1, p. 110421, 2019
- [105] www.dpd.cdc.gov/dpdx.