

Introdução

Durante os últimos vinte anos tem se acentuado o uso das técnicas de microscopia de fluorescência, espectroscopia de fluorescência e fluorescência resolvida no tempo em ciências multidisciplinares de biotecnologia (Bashford et al., 1979, Vanderkooi, 1984, Louro et al., 1994, Ladokhin et al., 2000, Baruah et al., 2006, Zelent et al., 2006, Lakowicz, 2006, Lu et al., 2007). Dada a alta sensibilidade de detecção das técnicas de fluorescência, elas têm se tornado ferramentas essenciais em muitas áreas de pesquisa tais como diagnósticos médicos, sequenciamento de DNA, análise genética, mapeamento estrutural de células, determinação de constantes de ionização de fármacos, caracterização de complexos de fármacos com metais, análise da interação de fármacos anfífilos com proteínas de membrana e lipídeos, determinação da localização de moléculas intracelulares.

O desenvolvimento de agentes que permitem a realização de intervenções cirúrgicas sem dor é de fundamental importância para as áreas biomédicas (Goth, 1976). Os agentes anestésicos são divididos na farmacologia em dois grandes grupos, os anestésicos locais (AL) e os anestésicos gerais (AG). Os AL são comumente utilizados para induzir a anestesia local sem produzir inconsciência. Estes fármacos são amplamente administrados na clínica médica e odontológica, promovendo o efeito físico-químico da anestesia local com intensidade muitas vezes suficiente à dispensa do uso de AG.

Os antibióticos fluoroquinolonas são agentes antimicrobianos sintéticos utilizados clinicamente há mais de 30 anos. Além de sua atividade antibacteriana (Vilchez et al., 2001), algumas fluoroquinolonas vêm sendo aplicadas no desenvolvimento de drogas anticancerígenas e anti-HIV. Elementos metálicos estão sempre presentes em todos os organismos e suas funções farmacológicas nos processos biológicos não podem ser negligenciadas (Turel et al., 1996, Song et al., 2004, 2005, Wang et al., 2008, Yegorova et al., 2007). Deste modo, o estudo de complexos de fármacos com metais mostra-se essencial para se compreender a eficácia de muitos fármacos.

A estrutura química de muitas moléculas com aplicação farmacológica envolve um grupo amida ou amina terciária e anéis aromáticos. As aminas terciárias têm um pK_a próximo do pH fisiológico (Louro et al., 1994). Os anéis aromáticos são os responsáveis pelas propriedades de fluorescência, as quais variam em função do estado de ionização da molécula e de seu meio. Muitos processos biológicos ocorrem na superfície de membranas ou conjuntamente em seu interior hidrofóbico. Devido aos grupos ionizáveis dos lipídeos, a superfície das membranas biológicas frequentemente apresenta-se carregada, permitindo assim a formação de diferentes ligações de espécies moleculares que possuem grupos ionizáveis carregados ou não carregados. Frequentes trabalhos têm sido realizados em fármacos no intuito de analisar seus efeitos funcionais nos sistemas biológicos (Franks et al., 1982, Kutchai et al., 2001, Sakagushi et al., 2006, Cassuto et al., 2006). Por outro lado, técnicas experimentais têm sido aplicadas para investigar as propriedades físico-químicas dos fármacos, seus efeitos na organização conformacional da bicamada lipídica e na diminuição da liberdade de movimento das moléculas do próprio anestésico quando ligadas à membrana (Lee A. G., 1976, Ohki, 1984, Barriviera et al., 2005, Ragsdale et al., 1994).

Para se analisar as interações de fármacos ionizáveis com sistemas biológicos o primeiro passo é conhecer a concentração das espécies carregadas e não carregadas envolvidas em função do pH. Neste sentido, o modelo físico adotado para o nosso sistema experimental associado aos anestésicos locais assumirá que somente duas espécies cromóforas estão envolvidas no equilíbrio iônico do hidrogênio e que a formação de agregados pode interferir nas propriedades espectroscópicas, incluindo os valores dos tempos de vida de fluorescência associados a cada espécie.

O comprimento de onda do máximo de emissão de muitos fármacos varia dependendo da polaridade e da rigidez do meio ambiente local. A associação de peptídeos e proteínas a membranas freqüentemente resulta em mudanças no espectro de fluorescência. Tais mudanças podem ser utilizadas para se estudar o particionamento das moléculas entre a membrana e o meio aquoso. Contudo, dois pontos devem ser considerados em tais estudos: a escolha de um parâmetro espectral relacionado à ligação do fluoróforo e a correção do espalhamento da luz. O parâmetro espectroscopicamente observável deve ser preferencialmente uma função de resposta linear, ou seja, a mudança fracionária no parâmetro deve

coincidir com a mudança fracionária na quantidade de uma espécie molecular particular, tal como ligação versus não ligação ou incorporação versus não incorporação. Em nosso modelo, esperamos que o espectro de fluorescência do fármaco na ligação seja acompanhado de um deslocamento espectral para o azul, o que indicará a incorporação do fármaco à membrana, dado que a membrana é um meio hidrofóbico com constante dielétrica efetiva menor que o meio aquoso, e de um aumento da intensidade inicial de fluorescência (Lakowicz, 2006).

1.1

Objetivos

Neste trabalho de pesquisa estudaremos os anestésicos locais dibucaína (Dib) e tetracaína (TTC) e os antibióticos norfloxacin (NF) e levofloxacin (LEV) e seus respectivos complexos com ouro (AuNF) e (AuLEV) a partir da técnica de fluorescência estacionária e fluorescência resolvida no tempo. Determinaremos os tempos de vida de fluorescência e as constantes de ionização, pK_a . Descreveremos ainda como as propriedades espectrais de fluorescência se alteram em função do pH. Investigaremos a interação da dibucaína com membranas enriquecidas com enzima Na,KATPase, a incorporação do fármaco à membrana. Determinaremos a constante de associação, a disponibilidade dos triptofanos e supressão de fluorescência do triptofano pela dibucaína. Desenvolveremos expressões para os fatores pré-exponenciais e as intensidades fracionárias associadas aos tempos de vida de fluorescência como função do pH para amostras fluorescentes, para obter a constante de equilíbrio da transição ácido base.

Este trabalho inaugura a utilização do fluorímetro resolvido no tempo no Departamento de Física da PUC-Rio. Assim, uma abordagem didática e sistemática foi realizada na apresentação dos resultados experimentais.

1.2

Estrutura dos capítulos

No capítulo 2 temos uma introdução aos conceitos de fluorescência utilizados neste trabalho de pesquisa. No capítulo 3 temos uma introdução sobre

membranas biológicas com ênfase em sua composição e estrutura. No capítulo 4 temos uma descrição dos fármacos estudados neste trabalho. No capítulo 5 apresentamos os materiais, equipamentos e métodos que foram empregados nas medidas experimentais e análises dos resultados.

No capítulo 6 apresentamos os resultados e discussões sobre o modelo matemático correto para os fatores pré-exponenciais e as intensidades fracionárias do decaimento da fluorescência como função do pH para amostras fluorescentes na transição ácido base. No capítulo 7 apresentamos os resultados e discussões sobre as propriedades de fluorescência da dibucaína, norfloxacin e levofloxacin. No capítulo 8 apresentamos os resultados e discussões sobre a interação da dibucaína em membrana e tetracaína em membrana.