



Fabício Casarejos Lopes Luiz

**Estudos de fluorescência estacionária e resolvida
no tempo de anestésicos locais
e de antibióticos da classe das fluoroquinolonas**

Tese de Doutorado

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Física do Departamento de Física da PUC-Rio
como parte dos requisitos parciais para obtenção do
título de Doutor em Física.

Orientadora: Profa. Sônia Renaux Wanderley Louro

Rio de Janeiro
Outubro de 2009



Fabício Casarejos Lopes Luiz

**Estudos de fluorescência estacionária e resolvida
no tempo de anestésicos locais
e de antibióticos da classe das fluoroquinolonas**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Física do Departamento de Física do Centro Técnico Científico da PUC-Rio. Aprovada pela Comissão Examinadora abaixo assinada.

Profa. Sônia Renaux Wanderley Louro
Orientadora
Departamento de Física – PUC-Rio

Profa. Eliane Wajnberg
CBPF

Profa. Leticia Regina de Souza Teixeira
UFMG

Prof. Marco Cremona
Departamento de Física – PUC-Rio

Profa. Maria Teresa Moura Lamy
USP

Prof. Jaime Fernando Villas da Rocha
UNIRIO

Prof. José Eugenio Leal
Coordenador Setorial do Centro
Técnico Científico – PUC-Rio

Rio de Janeiro, 19 de outubro de 2009

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, do autor e da orientadora.

Fabricio Casarejos Lopes Luiz

Graduou-se em Física na UERJ (Universidade do Estado do Rio de Janeiro) em 2002. É mestre em Física pela UERJ, na área de Cosmologia, tendo obtido o título em 2005.

Ficha Catalográfica

Luiz, Fabrício Casarejos Lopes

Estudos de fluorescência estacionária e resolvida no tempo de anestésicos locais e de antibióticos da classe das fluoroquinolonas / Fabrício Casarejos Lopes Luiz ; orientadora: Sônia Renaux Wanderley Louro. – 2009.

154 f. ; 30 cm

Tese (Doutorado em Física) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

Inclui bibliografia

1. Física – Teses. 2. Biofísica. 3. Anestésicos. 4. Fluorquinolonas. 5. Na. 6. K-ATPase. 7. Espectroscopia. 8. Fluorescência. 9. Fluorescência resolvida no tempo. I. Louro, Sônia Renaux Wanderley. II. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Física. III. Título.

CDD: 530

Ao meu filho Josué M. Casarejos.

Agradecimentos

A minha orientadora, professora Sônia Renaux Wanderley Louro pela confiança e dedicação neste trabalho de pesquisa.

Ao Prof. Carlos Frederico Fontes, do Instituto de Bioquímica Médica da UFRJ, pelas discussões e por ter cedido as membranas de Na⁺,K⁺-ATPase. À banca, pelos comentários e sugestões enriquecedoras.

E a todos que me acompanharam nesta trajetória tão infinda: minha mãe Lourdes, meu pai Josué, Tio Ari, Tia Isabel, Tia Cida, minhas irmãs Patrícia e Priscila, Alberto Bertolazzi, Tadeu Dal'Acqua, Jaime Roch, Ivan Engel, Otavio Castro, João Roberto, Ricardo Rosa, Gabriel Grossi, Jefferson Gonçalves, Mazinho da Silva, Marcus B2, Sérgio Castanheira, Gabriel Gomes, Ricardo Fiorini, Mila Tiso, Mônica Coelho, Germana Reis, Diego Moura, Rodrigo Motta, Leandro di Bartolo, Elmer Chevara, Bruno Lastorina.

Ao CNPq e a CAPES, pelos auxílios concedidos, sem os quais este trabalho não poderia ter sido realizado.

Resumo

Luiz, Fabrício Casarejos Lopes; Louro, Sônia Renaux Wanderley (Orientadora). **Estudos de fluorescência estacionária e resolvida no tempo de anestésicos locais e de antibióticos da classe das fluoroquinolonas**. Rio de Janeiro, 2009. 154p. Tese de Doutorado – Departamento de Engenharia Elétrica, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Durante as últimas décadas tem-se acentuado o desenvolvimento de técnicas de fluorescência e suas aplicações em biociências e biotecnologia. Dada sua alta sensibilidade de detecção, tais técnicas têm-se tornado ferramentas importantes em muitas áreas de pesquisa tais como diagnósticos médicos, análise genética, mapeamento estrutural de células, estudos de fármacos, caracterização de complexos de fármacos com metais, análise da interação de fármacos com proteínas, lipídeos e DNA. Os anestésicos locais são fármacos que bloqueiam reversivelmente a condução nervosa quando aplicados a uma região circunscrita do corpo. Entretanto, possuem uma variedade de efeitos nos sistemas biológicos que não somente os efeitos de anestesia. Os antibióticos fluoroquinolonas são agentes antimicrobianos sintéticos utilizados clinicamente há mais de 30 anos. Além de sua atividade antibacteriana, algumas fluoroquinolonas vêm sendo aplicadas no desenvolvimento de drogas anticancerígenas e anti-HIV. O pH local de muitos meios biológicos tem grande influência nas propriedades espectroscópicas de muitos fármacos. Suas constantes de ionização, pK_a , podem ser obtidas experimentalmente através de medidas espectroscópicas tais como absorvância, intensidade de fluorescência e parâmetros da fluorescência resolvida no tempo. Neste trabalho estudamos a partir da técnica de fluorescência estacionária e fluorescência resolvida no tempo os anestésicos locais dibucaína e tetracaína. Estudamos também os antibióticos norfloxacin e levofloxacin e seus respectivos complexos com ouro. Determinamos os tempos de vida de fluorescência e descrevemos ainda como as propriedades espectrais de fluorescência que se alteram em função do pH. Nos estudos de decaimento da fluorescência, desenvolvemos expressões para os fatores pré-exponenciais e as intensidades fracionárias de fluorescência como função do pH para amostras fluorescentes que sofrem transição ácido-base. Mostramos que os valores de pK_a são aparentemente deslocados e obtivemos as expressões para o deslocamento. Determinamos as constantes de ionização, pK_a , a partir da fluorescência estacionária e de parâmetros associados aos tempos de vida e testamos as expressões teóricas nos resultados experimentais. Os valores obtidos foram coerentes para as constantes de ionização dos fármacos dibucaína, levofloxacin e norfloxacin. Acredita-se que a ação dos anestésicos locais deve-se à interação das moléculas do anestésico com lipídeos e/ou proteínas de membrana. Uma análise desta interação mostra-se necessária para se investigar a difusão do anestésico na membrana e seu efeito na organização e dinâmica dos lipídeos e proteínas que constituem a membrana. Investigamos a interação da dibucaína e tetracaína com membranas enriquecidas em Na,K-ATPase e a incorporação do fármaco à membrana. Determinamos as constantes de associação. O valor obtido para a dibucaína foi de $0.91 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ e para a tetracaína $0.77 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$. Estudamos a acessibilidade dos triptofanos por supressão de fluorescência do triptofano pela dibucaína, obtivemos uma acessibilidade de 90% para os triptofanos e uma constante de supressão dinâmica de $4.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

Palavras-chave

Biofísica, anestésicos, fluoroquinolonas, Na,K-ATPase, espectroscopia, fluorescência, fluorescência resolvida no tempo.

Abstract

Luiz, Fabrício Casarejos Lopes; Louro, Sonia Renaux Wanderley (Advisor). **Steady state and time resolved fluorescence studies of local anesthetics and fluoroquinolone antibiotics**. Rio de Janeiro, 2009. 154p. Doctorate Thesis – Departamento de Engenharia Elétrica, Pontifícia Universidade Católica do rio de Janeiro.

During the last decades the development of fluorescence techniques and their applications in bioscience and biotechnology has been accentuated. Due to high sensitivity, such techniques have become important tools in many research areas such as medical diagnosis, genetic analysis, structural mapping of cells, drug investigation, characterization of drug-metal complexes, analysis of drugs interaction with proteins, lipids and DNA. The local anesthetics are drugs that reversibly block the nervous impulse when applied to a limited region of the body. However, they possess a variety of additional effects in the biological systems. The fluoroquinolone derived antibiotics are synthetic antimicrobial agents that have been used clinically for more than 30 years. In addition to their antibacterial activity, some fluoroquinolones have been applied in the development of anticancer drugs and anti-HIV. The local pH of many biological environments has great influence in the spectroscopic properties of many drugs, including local anesthetics and fluoroquinolones. The ionization constants of the drugs, pK_a , can be experimentally obtained via spectroscopic parameters such as absorbance, fluorescence intensity, and time-resolved fluorescence parameters. In this work we studied the local anesthetics dibucaine and tetracaine using steady state and time resolved fluorescence techniques. We also studied the antibiotics norfloxacin and levofloxacin and their complexes with gold. We determined the fluorescence lifetimes and described how the spectral fluorescence properties alter as a function of the pH. In the studies of fluorescence decay, we developed expressions for the pre-exponential factors and the fractional fluorescence intensities as a function of the pH for a fluorophore undergoing an acid-base transition. We showed that the pK_a values are apparently shifted and obtained the expressions for the pK shifts. We determined the ionization constants, pK_a from steady state fluorescence and from parameters associated with the lifetimes, and we tested the theoretical expressions using the experimental results. The observed pK shifts for dibucaine, levofloxacin and norfloxacin were found to agree with the theoretical expressions. The action of local anesthetics is believed to involve the interaction of the anesthetic molecules with lipids and/or membrane proteins. An analysis of this interaction is necessary to examine the anesthetic diffusion in the membrane and its effect in the organization and dynamics of the membrane lipids and proteins. We investigated the interaction of dibucaine with Na,K-ATPase enriched membranes, and the incorporation of the drug in the membrane. We determined the binding constants. The obtained values were $0.91 \times 10^3 M^{-1}$ for dibucaine and $0.77 \times 10^3 M^{-1}$ for tetracaine. We also studied the accessibility of the tryptophan residues using the fluorescence quenching by dibucaine. We obtained a dynamic quenching constant of $4.3 \times 10^4 M^{-1}$.

Keywords

Biophysics, local anesthetics, fluoroquinolones, Na^+,K^+ -ATPase, spectroscopy, fluorescence, time-resolved fluorescence.

Sumário

1.	Introdução	11
1.1	Objetivos	13
1.2	Estrutura dos capítulos	13
2.	Introdução à Fluorescência	15
2.1	O fenômeno da fluorescência.....	15
2.2	Fluorescência resolvida no tempo	22
2.3	Supressão de Fluorescência.....	25
2.4	Transferência de Energia.....	30
3.	Membranas Biológicas.....	33
3.1	Os limites das células	33
3.2	A Bicamada Lipídica.....	34
3.3	A mobilidade dos lipídeos na membrana	37
3.4	O Modelo do “Mosaico Fluido”	38
3.5	Bombas e Canais de Membrana	40
4.	Fármacos - Anestésicos Locais e Fluoroquinolonas	43
4.1	Introdução aos Anestésicos Locais	43
4.2	Equilíbrio de Ionização da Dibucaína	49
4.3	Introdução aos Antibióticos Fluoroquinolonas	50
4.4	Equilíbrio de Ionização das Fluoroquinolonas.....	52
4.5	Norfloxacina e Levofloxacina.....	53
5.	Materiais e Métodos.....	55
5.1	Materiais.....	55
5.2	Equipamentos	56
5.3	Métodos.....	59
5.3.1	Síntese dos complexos de NF e Lev com ouro.....	59
5.3.2	Correções de espalhamento em fluorescência estacionária.....	60
5.3.3	Efeitos de filtro interno no sistema Dib-triptofano.....	68
5.3.4	Determinação da constante de associação através de métodos espectroscópicos	68
5.3.5	Supressão de fluorescência – Acessibilidade do supressor	71
6.	Resultados e Discussão I - Obtenção do pK_a a partir da fluorescência estacionária e resolvida no tempo	74
6.1	Equilíbrio de ionização	74
6.2	Obtenção da constante de ionização a partir de parâmetros espectroscópicos.....	75

6.3	Parâmetros espectroscópicos associados ao decaimento da fluorescência e obtenção da constante de ionização	76
7.	Resultados e Discussão II: Fluorescência da Dibucaína, Norfloxacina e Levofloxacina.....	81
7.1	Espectros de fluorescência estacionária da Dib	81
7.2	Fluorescência resolvida no tempo da dibucaína.....	82
7.3	Absorção ótica e fluorescência estacionária da NF e AuNF	89
7.4	Fluorescência resolvida no tempo da NF	96
7.5	Fluorescência resolvida no tempo da AuNF	101
7.6	Fluorescência resolvida no tempo da NF e AuNF em DMSO.....	105
7.7	Absorção ótica e fluorescência estacionária da LEV e AuLEV	106
7.8	Fluorescência resolvida no tempo da LEV	111
7.9	Fluorescência resolvida no tempo da AuLEV	114
8.	Resultados e Discussão III - Interação dibucaína-membrana e tetracaína-membrana.....	119
8.1	Espectros de Fluorescência Estacionária da Dibucaína em Membrana	119
8.2	A determinação da constante de dissociação da Dib e TTC em membrana.....	124
8.3	Fluorescência resolvida no tempo da dibucaína em membrana.....	127
8.4	Supressão de fluorescência e transferência de energia - interação da Dib com resíduos de triptofano em membrana	133
8.4.1	Fluorescência Estacionária.....	133
8.4.2	Acessibilidade dos resíduos de triptofano – equação de Stern -Volmer modificada	137
8.4.3	Fluorescência Resolvida no Tempo	138
9.	Conclusão.....	143
	Referências bibliográficas	148

Abreviações

AG	anestésicos gerais
AL	anestésicos locais
Dib	dibucaína
FQ	fluorquinolona
Lev	levofloxacina
NF	norfloxacina
TTC	tetracaína