

## 1. Introdução

As fenotiazinas são drogas usadas em tratamentos de doença mentais. Os mecanismos de ação destas drogas em moléculas biológicas como membranas e proteínas ainda não são totalmente entendidos. Elas são sensíveis à luz ultravioleta, sendo que sob irradiação formam outras espécies como fotoprodutos estáveis ou radicais livres. A ação das fenotiazinas depende muito de suas propriedades fotofísicas e fotoquímicas, em particular, de sua solubilidade no ambiente lipídico. Estas drogas, ao fotodegradar-se, vão perdendo suas propriedades farmacológicas reagindo de forma diferente com os sistemas biológicos, por exemplo, causando reações de fototoxicidade. Estes efeitos colaterais dos derivados de fenotiazinas, causados por irradiação UV, são também importantes clinicamente e sua origem é muitas vezes atribuída à formação de fotoprodutos (Chignell et. al., 1985).

Kochevar e Horn (1983) atribuíram o mecanismo de fototoxicidade dos derivados de fenotiazinas à formação de dímeros e polímeros maiores da droga, produzidos por irradiação da CPZ. Outros mecanismos consideram que o dano fotoquímico é produzido por radicais livres. Por isso é importante conhecer as propriedades fotofísicas e fotoquímicas destes fotoprodutos para conhecer melhor o mecanismo de ação dos derivados de fenotiazinas. Já havíamos encontrado certas espécies fluorescentes produzidos por fotodegradação da CPZ sob irradiação UV (Guevara et al., 2007).

A  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase é uma bomba de cátions responsável pelo transporte ativo de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  contra o gradiente eletroquímico. A enzima utiliza a energia química da hidrólise da ATP para convertê-la em trabalho mecânico, e por meio de mudanças conformacionais transporta os íons de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  através da membrana plasmática (Jorgensen, 1982; Swedner e Donnet, 2001). Encontramos que um fotoproduto da CPZ liga-se covalentemente na proteína (Guevara et al., 2007). O sítio de ligação da CPZ tem uma mesma estrutura local tanto na conformação  $E_1$  quanto na  $E_2$ , já que a reação foi independente do estado

conformacional da proteína. Usando o marcador fluorescente derivado da ouabaína, a antroilouabaína, avaliamos os efeitos estruturais da CPZ sobre o sítio de ouabaína. A CPZ torna o sítio de ouabaína mais hidrofóbico e o sítio de ligação da CPZ se localiza próximo ao sítio da ouabaína (Guevara et al., 2007).

DPH é uma sonda fluorescente hidrofóbica usada principalmente para estudos de propriedades dinâmicas e estruturais das membranas lipídicas (Kaiser e London, 1998). FITC é uma sonda fluorescente que marca a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase perto do sítio de ATP. Esta sonda é usada para estudar efeitos estruturais locais no sítio do ATP (Amler et al., 1992; Jorgensen et al., 2003).

Neste trabalho, caracterizamos os fotoprodutos fluorescentes de CPZ, FPZ e TFP criados por irradiação UV, em condições controladas, por meio da técnica de fluorescência. As interações destas fenotiazinas e de seus fotoprodutos (por meio da irradiação UV) com membranas enriquecidas em  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase foram estudadas com o fim de investigar o mecanismo de ação dos derivados de fenotiazinas. A CPZ, devido a seu caráter anfifílico, intercala-se entre os lipídios das bicamadas lipídicas e associa-se preferencialmente a grupos negativos localizados na superfície da membrana (Louro et al., 1998). Para estudar as mudanças nas propriedades dinâmicas e estáticas das membranas lipídicas por efeito dos derivados de fenotiazinas empregou-se a sonda DPH. Para estudar o efeito estrutural local do sítio de ATP foi utilizada a sonda FITC. A localização mais precisa das fenotiazinas nas membranas biológicas pode ser investigada conhecendo as localizações de FITC e de DPH na proteína e na membrana, respectivamente. O comportamento das proteínas de membranas parece ser também modulado indiretamente pela alteração da estrutura, termodinâmica ou propriedades dinâmicas da membrana lipídica (Cantor et al., 1999; Sutherland et al., 1988). Este efeito estrutural indireto sobre a proteína pode ser analisado usando as propriedades de fluorescência dos resíduos de triptofano.

Neste trabalho, aproveitamos também as propriedades físicas e químicas dos fotoprodutos das fenotiazinas em condições aeróbicas e anaeróbicas, para estudar uma possível aplicação dos derivados de fenotiazinas como sensores de oxigênio e de radiação UV.

## 1.1. Objetivos

Este trabalho tem os seguintes objetivos principais:

- I. Encontrar as propriedades de fluorescência dos fotoprodutos de fenotiazinas.
- II. Avaliar os fotoprodutos de fenotiazinas como sensores de oxigênio e de radiação ultravioleta, com leitura através da técnica de fluorescência.
- III. Estudar os sítios de ação dos derivados de fenotiazinas e os efeitos estruturais sobre as membranas enriquecidas de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase.

## 1.2. Estrutura dos capítulos

No capítulo 2 apresenta-se uma descrição das estruturas moleculares e das funções dos sistemas biológicos estudados, como a membrana celular e a proteína  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, dos fármacos derivados de fenotiazinas: clorpromazina (CPZ), fluofenazina (FPZ) e trifluoperazina (TFP), e dos marcadores fluorescentes DPH e FITC.

No capítulo 3 apresenta-se uma breve descrição dos fundamentos teóricos e experimentais das técnicas de espectroscopia de absorção e de fluorescência estacionária e resolvida no tempo. Também neste capítulo, de forma breve, comenta-se a técnica de espectrometria de massas.

No capítulo 4 identificam-se os materiais e descrevem-se os métodos empregados nas medidas experimentais e na análise dos espectros.

Os resultados e discussões são divididos em três partes:

- o estudo da fotodegradação dos derivados de fenotiazinas é mostrado no capítulo 5;

- as interações das fenotiazinas com as membranas usando DPH são mostradas no capítulo 6;
- as interações dos derivados de fenotiazinas com o sítio de ligação de ATP e com resíduos de triptofano na proteína são mostradas no capítulo 7.

No capítulo 8 apresentam-se as conclusões do trabalho e perspectivas para novas investigações.