



Elmer Augusto Cueva Guevara

**FOTODEGRADAÇÃO DE FENOTIAZINAS E SEUS
EFEITOS ESTRUTURAIS SOBRE A Na^+, K^+ -ATPase:
ESTUDO ATRAVÉS DE FLUORESCÊNCIA**

Tese de Doutorado

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Física pelo Programa de Pós-Graduação em Física do Departamento de Física da PUC-Rio.

Orientadora: Sônia Renaux Wanderley Louro

Rio de Janeiro, março de 2010



Elmer Augusto Cueva Guevara

**FOTODEGRADAÇÃO DE FENOTIAZINAS E SEUS
EFEITOS ESTRUTURAIS SOBRE A Na⁺,K⁺-ATPase:
ESTUDO ATRAVÉS DE FLUORESCÊNCIA**

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

Prof. Sônia Renaux Wanderley Louro

Orientadora

Departamento de Física – PUC-Rio

Prof. Amando Siuiti Ito

Departamento de Física e Matemática – FFCLRP – USP

Prof. Eliane Wajnberg

CBPF

Prof. Marcel Tabak

Instituto de Química de São Carlos – USP

Prof. Pedro Pascutti

Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – UFRJ

Prof. José Eugênio Leal

Coordenador Setorial de Pós-Graduação
Centro Técnico Científico – PUC-Rio

Rio de Janeiro, 08 de março de 2010

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

Elmer Augusto Cueva Guevara

Graduou-se em Física na UNPRG (Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo de Lambayeque - Perú) em 1998 com ênfase em Biofísica, Física Experimental e Ensino de Física. Terminou o mestrado em Física na PUC-Rio em 2005, na área de Espectroscopia de Biomoléculas.

Ficha Catalográfica

Cueva Guevara, Elmer Augusto

Fotodegradação de fenotiazinas e seus efeitos estruturais sobre a Na⁺, K⁺-ATPase: estudo através de fluorescência / Elmer Augusto Cueva Guevara ; orientadora: Sônia Renaux Wanderley Louro. – 2010.

153 f. : il. (color.) ; 30 cm

Tese (Doutorado em Física) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

Inclui bibliografia

1. Física – Teses. 2. Biofísica. 3. Fluorescência. 4. Fenotiazinas. 5. Fotodegradação. 6. Na,K-ATPase. I. Louro, Sônia Renaux Wanderley. II. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Física. III. Título.

CDD: 530

A meus pais e irmãos,
A Claudia Magali por seu amor e paciência,
Ao povo do Brasil.

Agradecimentos

A Deus, por dar-me a oportunidade de chegar até aqui.

A minha orientadora, professora Sônia Renaux Wanderley Louro, graças a seus conhecimentos e ensinamentos neste projeto e por ter acreditado em minha pessoa.

Ao Prof. Carlos Frederico Fontes, do Instituto de Biofísica da UFRJ, por ter gentilmente cedido as membranas de Na^+, K^+ -ATPase, preparadas em seu laboratório.

Ao pessoal do Departamento de Física da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Às instituições CNPq e FAPERJ pelo apoio financeiro.

Resumo

Guevara, Elmer Augusto Cueva; Louro, Sônia Renaux Wanderley. **Fotodegradação de fenotiazinas e seus efeitos estruturais sobre a Na^+, K^+ -ATPase: estudo através de fluorescência.** Rio de Janeiro, 2010. 153p. Tese de Doutorado - Departamento de Física, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Clorpromazina (CPZ), flufenazina (FPZ) e trifluoperazina (TFP) são derivados de fenotiazinas que, sob irradiação UV, geram fotoprodutos. Observou-se que CPZ desenvolve três fotoprodutos fluorescentes em diferentes condições. A promazina (PZ) se forma da fotólise de CPZ pela quebra da ligação com o cloro. A saída do cloro é um dos principais caminhos para a formação de outros fotoprodutos, sendo também um requisito para formação de dímeros e trímeros de CPZ. O segundo produto fluorescente é a espécie sulfóxida, que se desenvolve em presença de oxigênio somente em meio ácido e tem pico de fluorescência em ~ 370 nm. A terceira espécie, com pico triplo de emissão e máximo em 352 nm, se desenvolve predominantemente em ausência de oxigênio. Observou-se que as taxas de formação dos fotoprodutos fluorescentes são maiores em meio ácido. FPZ e TFP apresentaram o mesmo fotoproduto fluorescente (emissão ~ 410 nm), espécie que se desenvolve em presença de O_2 com as mesmas características da espécie sulfóxida. A fluorescência do fotoproduto da TFP foi testada como sensor de radiação UV e para detecção de pequenas quantidades de oxigênio. Estudando as interações com membranas contendo a enzima Na^+, K^+ -ATPase, mostrou-se que as fenotiazinas alteram a estrutura lipídica da membrana, já que aumentam a anisotropia de fluorescência da sonda de membrana DPH. Os resultados da interação das fenotiazinas com resíduos de triptofano da proteína mostraram supressão de fluorescência de mais da metade dos triptofanos, sem transferência de energia. A estrutura local do sítio de ATP na proteína Na^+, K^+ -ATPase, marcado com a sonda fluorescente FITC, não foi afetada pela interação com as fenotiazinas, sugerindo que a localização do sítio de ligação das fenotiazinas com a enzima fica longe do sítio de ATP.

Palavras-chaves

Biofísica; fenotiazinas; fotodegradação; Na^+, K^+ -ATPase; espectroscopia; fluorescência; clorpromazina; flufenazina; trifluoperazina; triptofano.

Abstract

Guevara, Elmer Augusto Cueva; Louro, Sônia Renaux Wanderley (Advisor). **Fotodegradation of phenothiazines and their structural effects on Na⁺,K⁺-ATPase: a fluorescence study**. Rio de Janeiro, 2010. 153p. Doctoral thesis – Departamento de Física, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Chlorpromazine (CPZ), fluphenazine (FPZ) and trifluoperazine (TFP) are phenothiazine derivatives, which generate photoproducts under UV irradiation. We observed that CPZ develops three fluorescent photoproducts under different conditions. Promazine (PZ) that forms from the CPZ photolysis. The chlorine loss is one of the main pathways for photoproduct formation and it seems to be a requirement for development of CPZ dimers or trimers. The sulfoxide species with fluorescence peak at ~ 370 nm develops in the presence of oxygen only in acid conditions. Another fluorescent species with structured emission and maximum at 352 nm develops primarily in the absence of oxygen. It was observed that the development rates of all fluorescent photoproduct are greater under acidic conditions. FPZ and TFP presented the same fluorescent photoproduct (emission ~ 410 nm), which develops in the presence of O₂ with the same characteristics as the sulfoxide derivative. The fluorescence of the TFP photoproduct was tested as a UV sensor and a sensor for detection of small amounts of oxygen. Studying the interactions with Na⁺, K⁺-ATPase enriched membranes, phenothiazines were shown to modify the membrane lipid structure since they increased the fluorescence anisotropy of the membrane probe DPH. The results of phenothiazine interaction with tryptophan residues of the enzyme showed fluorescence quenching of ~ 50% of the tryptophan residues, without energy transfer. The local structure of the Na⁺, K⁺-ATPase ATP binding site, labeled with FITC, was not affected by the interaction with the phenothiazines, suggesting that the phenothiazine sites are far from the ATP binding site.

Keywords

Biophysics; antidepressant; antipsychotic; Na,K-ATPase; spectroscopy; fluorescence; chlorpromazine; fluphenazine; trifluoperazine.

Sumário

1 .	Introdução	11
1.1.	Objetivos	13
1.2.	Estrutura dos capítulos	13
2 .	O sistema biológico	15
2.1.	Moléculas Biológicas	15
2.2.	Antipsicóticos derivados de fenotiazina	18
2.2.1.	Clorpromazina (CPZ)	20
2.2.2.	Flufenazina (FPZ) e trifluoperazina (TFP)	23
2.3.	Membrana Biológica	25
2.3.1.	Modelo de mosaico fluido	25
2.4.	A Enzima Na^+ , K^+ - ATPase	27
2.4.1.	Características Estruturais da Na^+ , K^+ - ATPase	28
2.4.2.	Características funcionais	31
2.5.	Sondas fluorescentes	33
3 .	Técnicas Experimentais	37
3.1.	Conceitos básicos de espectroscopia	37
3.2.	Espectroscopia de absorção	39
3.3.	Espectroscopia de fluorescência	41
3.3.1.	Medidas de fluorescência estacionária	43
3.3.2.	Fluorescência resolvida no tempo	45
3.3.3.	Supressão de fluorescência	50
3.3.4.	Anisotropia de fluorescência	53
3.4.	Espectrometria de massa	61
4 .	Materiais e Métodos	65
4.1.	Materiais	65
4.1.1.	Frações de membranas - Na^+ , K^+ - ATPase	65
4.1.2.	Reagentes	65
4.1.3.	Sondas fluorescentes	66
4.1.4.	Instrumentação	67
4.2.	Procedimentos Experimentais	68
4.2.1.	Absorção óptica	68

4.2.2. Fluorescência estacionária	68
4.2.3. Fluorescência com resolução temporal	73
5 . Formação de fotoprodutos fluorescentes de fenotiazinas	77
5.1. Absorção e Fluorescência das Fenotiazinas	77
5.2. Fotodegradação das Fenotiazinas.	79
5.2.1. Absorção das fenotiazinas sob fotodegradação	80
5.2.2. Fluorescência dos produtos de fotodegradação das fenotiazinas	84
5.2.3. Espectrometria de massa das fenotiazinas irradiadas.	98
5.2.4. Discussão sobre a fotodegradação de fenotiazinas	106
5.3. Fenotiazinas como sensor óptico de oxigênio e de radiação ultravioleta baseado na fotodegradação	110
5.3.1. Arranjo experimental	111
5.3.2. Resultados da variação da fluorescência com a dose de radiação e com a concentração de oxigênio	112
6 . Interações das fenotiazinas com os fragmentos de membranas Na ⁺ , K ⁺ - ATPase	115
6.1. Resultados da interação de CPZ com membranas - Na ⁺ , K ⁺ - ATPase	116
6.1.1. Supressão da intensidade de fluorescência	117
6.1.2. Tempos de vida de fluorescência de DPH	119
6.1.3. Anisotropia - fluorescência estacionária	122
6.2. Interação de TFP com membranas - Na ⁺ , K ⁺ - ATPase	124
6.2.1. Supressão da intensidade da fluorescência	124
6.2.2. Decaimento de fluorescência	124
6.2.3. Anisotropia - fluorescência estacionária	127
6.3. Decaimento de anisotropia de DPH – cinética e ordem dos lipídios	129
6.3.1. Efeitos das fenotiazinas no decaimento de anisotropia de DPH	130
6.3.2. Anisotropia de fluorescência de DPH em membranas de crustáceo normal e adaptado	133
7 . Efeitos estruturais na Na ⁺ , K ⁺ -ATPase devido às fenotiazinas	135
7.1. Interação da TFP com a Na ⁺ , K ⁺ -ATPase	136
7.1.1. Irradiação no UVB da TFP em presença da Na ⁺ , K ⁺ -ATPase	140
7.2. Interação da CPZ com a Na ⁺ , K ⁺ -ATPase marcada com FITC	142
8 . Conclusão	145
9 . Referências Bibliográficas	147

Abreviações

AO	antroil-oubaína
ATP	adenosina trifosfato
ATPase	adenosina trifosfatase
CPZ	clorpromazina
DPH	1,6-Difenil-1,3,5-hexatrieno
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
FPZ	flufenazina
FITC	fluoresceína isotiocianato
LDI	ionização por dessorção a laser
Pi	fosfato inorgânico
PZ	promazina
TFP	trifluoperazina
UV	ultravioleta