

TMUP
148
2007

U. PORTO

FC FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Isabel Cristina de Sá Correia de Sousa

Interacção da Enrofloxacina com modelos
biomembranares: Influência das suas propriedades
físico-químicas

QD549.2
SOUi I
2007



FC

Biblioteca
Faculdade de Ciências
Universidade do Porto



D000119511

Victor Fucile

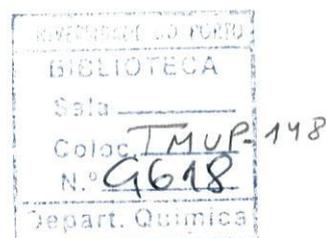
Isabel Cristina de Sá Correia de Sousa
Licenciada em Química (FCUP)



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Isabel Cristina de Sá Correia de Sousa

Interacção da Enrofloxacina com modelos
biomembranares: Influência das suas propriedades
físico-químicas



Dissertação submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto para a obtenção do
grau de Mestre em Tecnologia, Ciência e Segurança Alimentar

Departamento de Química
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

2007

Índice Geral

Índice de Figuras	vii
Índice de Tabelas	xi
Abreviaturas	xiii
Agradecimentos	xv
Resumo	xvii
Abstract	xix
Résumé	xxi
Capítulo I: Introdução Teórica	3
1. Quinolonas: Breve introdução e caracterização geral.....	3
1.1. Do Ácido Nalidíxico aos dias de hoje.....	3
1.1.2. As Fluoroquinolonas.....	6
1.1.2.1. Propriedades físico-químicas.....	7
1.3. Mecanismo de acção e resistência.....	9
1.3.1. Mecanismo de acção.....	9
1.3.2. Mecanismos de resistência.....	10
1.4. Fluoroquinolonas e Medicina Veterinária.....	10
1.4.1. Enrofloxacin e Enrofloxacin vs Ciprofloxacina.....	10
1.4.2. Fármacos de uso Veterinário: Influência a nível alimentar.....	11
1.4.2.1. Uso de quinolonas em animais na perspectiva da segurança alimentar.....	12
1.5. Estudo da interacção de quinolonas com modelos biomembranares.....	13
2. Estrutura bacteriana.....	14
2.1. Caracterização geral.....	14
2.2. Membrana Externa da Bactérias Gram (-).....	15
2.3. Proteína F da Membrana Externa (OmpF).....	16
2.3.1. Caracterização geral.....	16
2.3.2. Selectividade iónica.....	17
2.3.3. Propriedades físico-químicas.....	19
2.3.3.1. Estabilidade.....	19
2.3.3.2. Propriedades espectroscópicas.....	19
3. Modelos Membranares.....	20
3.1. Lipossomas.....	21
3.1.2. Propriedades físico-químicas dos fosfolípidos.....	22
3.1.3. Preparação de Lipossomas.....	25
3.2. Sistemas lipossómicos.....	26
3.2.1. Reconstituição de proteínas membranares: Proteolipossomas.....	27

3.2.1.2. Proteolipossomas: Metodologias de reconstituição.....	28
Reconstituições mediadas por detergente	28
Capítulo II: Metodologia Experimental.....	33
1. Reagentes e soluções.....	33
2. Instrumentação	34
3. Preparação de lipossomas.....	35
4. Preparação de proteolipossomas	35
4.1. Reconstituição da proteína membrana OmpF em lipossomas pré-preparados por Cromatografia de Exclusão	36
5. Doseamento de lípidos	36
6. Doseamento de proteína.....	36
7. Determinação de coeficientes de partição por espectrofluorimetria	37
8. Estudos de localização membrana	38
8.1. Extinção de fluorescência da Enrofloxacina pelo ião iodeto.....	38
8.2. Anisotropia de Fluorescência em lipossomas e proteolipossomas.....	38
8.3. Extinção de fluorescência de OmpF pelo ião iodeto na presença e ausência de Enrofloxacina	39
8.4. Determinação de constantes de associação Enrofloxacina/OmpF	39
8.5. Estudos de Condutividade Eléctrica de OmpF na presença de Enrofloxacina.....	40
9. Modelos matemáticos experimentais	42
9.1. Coeficientes de Partição	42
9.1.1. Determinação de coeficientes de partição por Espectrofluorimetria.....	42
9.1.2. Modelos Matemáticos para a determinação de coeficientes de partição.....	43
9.2. Estudos de localização membrana	44
9.2.1. Extinção de fluorescência.....	44
9.2.1.1. Extinção de fluorescência dinâmica.....	45
9.2.1.2. Extinção de fluorescência estática.....	45
9.2.1.3. Agentes de extinção de fluorescência	49
9.2.2. Extinção de fluorescência de proteínas	49
9.2.3. Anisotropia de Fluorescência	50
9.2.3.1. Sondas de fluorescência para estudos de anisotropia	52
9.3. Determinação de constantes de associação	52
9.4. Determinação da transposição membrana de fármacos mediada por canais iónicos.....	54
9.4.1. Aplicação de BLP no estudo da condutividade iónica de canais porínicos.....	54
9.4.2. OmpF: Propriedades electrofisiológicas e difusão membrana.....	55
Capítulo III: Resultados e discussão.....	59

1. Determinação de coeficientes de partição entre uma solução aquosa de Enrofloxacin e lipossomas de DMPC e DMPG.....	60
1.1. Determinação de Kp's por Espectrofluorimetria.....	61
1.2. Localização membranar da fluoroquinolona Enrofloxacin e LUV's de DMPC e DMPG	63
1.2.1. Extinção de Fluorescência da Enrofloxacin pelo ião Iodeto	64
1.3. Conclusões	68
2. Reconstituição da proteína membranar OmpF.....	69
2.1.2. Caracterização de proteolipossomas por dispersão de luz	72
2.1.3. Caracterização de proteolipossomas por Anisotropia de Fluorescência	73
3. Interação da Enrofloxacin com OmpF.....	78
3.1. Extinção de Fluorescência de OmpF, em proteolipossomas, pelo ião Iodeto na ausência e presença da Enrofloxacin	79
3.2. Extinção de Fluorescência de OmpF, em proteolipossomas, pelo ião Iodeto na presença da Enrofloxacin	82
3.3. Extinção de Fluorescência de OmpF, em proteolipossomas, em presença da Enrofloxacin	84
3.4. Conclusões	87
3.5. Alterações à condutividade iônica de OmpF.....	88
3.5.1. Conclusões	92
Capítulo IV: Considerações Finais	95
Capítulo V: Bibliografia	101

Índice de Figuras

Figura 1 – Núcleo base das 4-oxo-1,4-dihidroxiquinolonas vs estrutura do Ácido Nalidíxico.....	4
Figura 2 – Evolução das quinolonas: as diferentes gerações, baseada na referência ^[1]	5
Figura 3 – Estrutura molecular da Enrofloxacina (A) vs Ciprofloxacina (B).....	11
Figura 4 – Representação esquemática da parede celular de uma bactéria Gram (-). (Adaptado de: http://diverge.hunter.cuny.edu/~weigang/Lecture-syllabus.html	15
Figura 5 – Representações esquemáticas da estrutura de OmpF. A) Organização de OmpF em trímero (estrutura quaternária) vista do topo da membrana (lado extracelular). B) Organização estrutura do monómero (estrutura terciária) no plano membranar. ^[38] ...	17
Figura 6 – Zona de constrição de OmpF (vista de topo, perpendicularmente à membrana). A zona de constrição é constituída pelos resíduos ácidos Glu117 e Asp113 (provenientes de L ₃ e carregados negativamente) e por quatro resíduos pertencentes à estrutura do barril β, opostos a L ₃ , Lys16, Arg42, Arg82, Arg132.....	18
Figura 7 – Aminoácidos, presentes em OmpF, que possuem Fluorescência: (A) Triptofano, (B) Tirosina e (C) Fenilalanina.....	19
Figura 8 – Representação esquemática dos diferentes tipos de vesículas lipossômicas. (adaptado da página da Internet da Avanti Polar Lipids: www.avantilipids.com)	22
Figura 9 – Representação esquemática de (A) glicerofosfolípido, (B) esfingofosfolípido e (C) grupos que podem esterificar o grupo fosfato.....	23
Figura 10 – Fórmulas estruturais de fosfolípidos (A) naturais e (B) e (C) sintéticos.....	24
Figura 11 – Representação esquemática da transição de fase em bicamadas lipídicas (adaptado de http://cellbio.utmb.edu/cellbio/membrane_intro.htm).....	25
Figura 12 – Representação esquemática da preparação de MLV's pelo método de hidratação do filme lipídico. 1) Dissolução dos lípidos num solvente orgânico adequado; 2) Formação do filme lipídico nas paredes do balão, por evaporação do solvente orgânico; 3) Hidratação do filme por adição de solução aquosa; 4) Agitação e obtenção de MLV's; 5) SUV's ou LUV's obtidas por sonicação ou extrusão (adaptado da página da Internet da Avanti Polar Lipids: www.avantilipids.com).....	26
Figura 13 – (a) Célula de Trabalho, (b) fotografia de microscópio electrónico do orifício da membrana de Teflon, (c) ilustração da bicamada lipídica com OmpF inserida, (d) registo do aumento de intensidade de corrente por inserção de OmpF na bicamada. ^[72]	40
Figura 14 – Gráfico para determinação da influência do efeito de filtro interno nos ensaios efectuados com soluções de Enrofloxacina de Abs>0,1.....	43
Figura 15 – Fórmulas de estrutura das sondas DPH e TMA-DPH.....	52
Figura 16 – Inserção de um trímero de OmpF. ^[71]	55

Figura 17 – Influência da permeação de um antibiótico (Ampicilina) na corrente iônica de OmpF. ^[71]	56
Figura 18 – Espectro de emissão da Enrofloxacina (7,4μM) na ausência (1) e presença de suspensão de (A) DMPC e (B) DMPG de concentração crescente (2 a 8). Concentrações de DMPC (μM): (2) 106, (3) 211, (4) 338, (5) 436, (6) 551, (7) 634, (8) 739, (9) 845 e DMPG (μM) (2) 88, (3) 165, (4) 243, (5), 248 (6) 413, (7) 496, (8) 578, (9) 661.	62
Figura 19 – Ajuste não linear da equação (1.2) aos valores experimentais obtidos ao λ máximo de emissão (414nm) da Enrofloxacina, para concentrações crescentes de (A) DMPC e (B) DMPG.	63
Figura 20 – (A) Espectro de UV-Vis da Enrofloxacina (7,4μM) na ausência (1) e presença (2 a 10) de concentrações crescentes de KI e (B) variação da intensidade de fluorescência corrigida da Enrofloxacina (7,4μM) em função da concentração de KI na ausência (■) e presença de 500μM de (●) DMPC e (▲) DMPG.	65
Figura 21 – Representação gráfica da equação de Stern-Volmer, equação (2.0), para a extinção de fluorescência da Enrofloxacina em função da concentração de KI na ausência (■) e presença de 500μM de (●) DMPC e (▲) DMPG. Comprimento de onda de excitação 272nm e emissão a 314nm.	66
Figura 22 – Estratégias de reconstituição mediadas por detergente desde a extracção da proteína da sua membrana nativa à sua reconstituição. ^[57]	70
Figura 23 – Espectro de (A) UV-Vis das amostras retiradas da coluna de exclusão e (B) espectro de Fluorescência das amostras que apresentam, no espectro de UV-Vis, sinal de terem presente lipossomas e proteína. Concentração na mistura de OmpF e DMPC: 0,86mM e 2,0mM, respectivamente.	71
Figura 24 – Distribuição de tamanho de (A) lipossomas preparados por extrusão e (B) proteolipossomas preparados por cromatografia de exclusão (fracção mais concentrada).	72
Figura 25 – Representação esquemática ^[83] da inserção de uma proteína de comprimento hidrofóbico d_p em bicamadas fosfolipídicas de espessura d_L onde, a espessura hidrofóbica d_L é menor (A) ou maior (B) que d_p	74
Figura 26 – Variação da anisotropia de fluorescência, em função da temperatura, das sondas de fluorescência (A) DPH e (B) TMA-DPH para (■) LUV's de DMPC e (●) proteolipossomas (A ₁) e (B ₁) por incubação e (A ₂) e (B ₂) por incorporação.	74
Figura 27 – Orientação estrutural de um trímero de OmpF e posicionamento dos resíduos de triptofano em cada monómero – vista de topo O (Trp ²¹⁴) e O (Trp ⁶¹). ^[46]	80

- Figura 28 – (A) Espectro de emissão de fluorescência de OmpF inserida em lipossomas de DMPC na ausência (---) e presença (—) de concentrações crescentes de KI. Comprimento de onda de excitação de 290nm e (B) Representação gráfica da equação de Stern-Volmer (2.8) para a extinção de fluorescência de OmpF em lipossomas de DMPC em função da concentração de KI. 80
- Figura 29 – (A) Espectro de UV-Vis e (B) Espectro de emissão de fluorescência de OmpF inserida em lipossomas de DMPC (na presença de Enrofloxacina) na ausência (---) e presença (—) de concentrações crescentes de KI. Comprimento de onda de excitação de 290nm. 83
- Figura 30 – Representação gráfica da equação de Stern-Volmer para a extinção de fluorescência de OmpF em lipossomas de DMPC, em função da concentração de KI. 83
- Figura 31 – (A) Espectro de UV-Vis e (B) Espectro de emissão de OmpF inserida em proteolipossomas de DMPC na ausência (---) e presença (—) de concentrações crescentes de Enrofloxacina (0 a 18,8 μ M). $\lambda_{ex} = 290$ nm. 85
- Figura 32 – (A) Ajuste não linear à equação (3.7) e (B) ajuste linear da variação da fluorescência de OmpF por adição de concentrações crescentes de Enrofloxacina (0-18,8 μ M). O comprimento de onda de excitação utilizado foi 290nm e a análise realizada a 322nm. 86
- Figura 33 – Condutância iônica através de OmpF (A) – 50mV e (B) + 50mV, na ausência (—) e presença de 3,5mM de ENR (—) (escala ampliada). 89
- Figura 34 – Espectro de densidade espectral (A) – 50mV e (B) + 50mV, na ausência (—) e presença de concentrações crescentes de Enrofloxacina: (—) 250 μ M; (—) 400 μ M; (—) 500 μ M; (—) 1,0mM; (—) 2,0mM; (—) 2,5mM; (—) 3,0mM; (—) 3,5mM. 90
- Figura 35 – (A) Ajuste lorentziano aos resultados obtidos para concentrações de enrofloxacina de 3,5mM. (B) Frequência angular obtida a partir do ajuste aos espectros de densidade espectral para as diferentes concentrações de antibiótico. 91

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Valores de pK_{a1} e pK_{a2} associados às constantes de dissociação e propriedades físico-químicas para a Enrofloxacin e Ciprofloxacina. ^[13]	8
Tabela 2 – Intervalos de concentração de Enrofloxacin, em tampão Hepes, para os quais é válida a lei de Lambert-Beer.	61
Tabela 3 – Coeficientes de partição, entre uma fase aquosa e uma fase lipídica de DMPC e DMPG, para Enrofloxacin obtidos por espectrofluorimetria.	63
Tabela 4 – Valores da constante de Stern-Volmer para a extinção de fluorescência da Enrofloxacin pelo ião iodeto, na ausência e presença de LUV's de DMPC e DMPG.	66
Tabela 5 – Tamanho médio dos lipossomas, na presença de Enrofloxacin, na ausência e presença de 0,220M de KI.....	67
Tabela 6 – Tamanho médio dos proteolipossomas obtidos por cromatografia de exclusão.....	73
Tabela 7 – Valores de temperatura de transição para lipossomas de DMPC e proteolipossomas OmpF/DMPC, obtidos por ajuste dos resultados à equação (3.4).....	75
Tabela 8 – Valores das constantes de Stern-Volmer modificadas e respectiva fracção acessível para a extinção de fluorescência de Trp e OmpF em diferentes meios.	81
Tabela 9 – Valores obtidos para a constante de associação Enrofloxacin/OmpF e Ciprofloxacina/OmpF através do ajuste não linear (3.7) aos dados experimentais.....	86

Abreviaturas

ADN (DNA) – Ácido desoxirribonucleico

BLP – Bicamada lipídica planar

BSA – Albumina de soro bovino

CIPRO – Ciprofloxacina

CMC – Concentração micelar crítica

DMPC – Dimiristoílfosfatidilcolina

DMPG – Dimiristoílfosfatidilglicerol

DPH – 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno

DPhPC – Difitanoílfosfatidilcolina

ENR – Enrofloxacin

FDA – Food and Drug Administration

HEPES – Ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N-etanossulfónico

LPS – Lipopolissacarídeo

LUV's – Large Unilamellar Vesicles

MES – Ácido 2-(N-morfilino)etanossulfónico

OmpF – Proteína F da membrana externa

SDS – Dodecilsulfato de sódio

SNS – Sistema Nervoso Central

TMA-DPH – (1-(4-trimetilamoniofenil)-6-fenil-1,3,5-hexatrieno)

Agradecimentos

Na fase final deste trabalho, queria agradecer a todos que contribuíram para a sua realização.

À Professora Doutora Paula Gameiro por toda a disponibilidade, orientação, apoio e incentivo constantes, pela amizade e atenção demonstradas.

À comissão de mestrado em Tecnologia, Ciência e Segurança Alimentar, especialmente ao Professor Doutor Nuno Mateus e ao Professor Doutor Victor de Freitas pela possibilidade de desenvolver um trabalho de investigação nesta área.

Ao Professor Doutor Mathias Winterhalter da “Jacobs University Bremen” pela estadia agradável e a possibilidade de aprender novas técnicas, assim como a todos os membros do laboratório de Biofísica e Microbiologia da Jacobs University, especialmente à Marcella, ao Mahendran, ao Tivadar e ao Yannick pela sua amizade, simpatia, boa disposição, hospitalidade e ajuda durante a minha estadia na Jacobs University.

À Catarina Gonçalves e ao Professor Doutor Miguel Gama do Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho pela possibilidade de utilização do Zeta-Sizer para a caracterização dos lipossomas e proteolipossomas.

A todos os Professores Doutores do Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, pela disponibilidade e transmissão de conhecimentos ao longo de toda a minha educação superior.

Aos meus amigos e colegas do Departamento de Química pela ajuda, amizade, companheirismo e bons momentos, especialmente à Adelaide, Cláudia, Daniela, Rosa Bela, Sónia, ao Pedro e, acima de tudo, à Patrícia por tudo.

Aos meus pais por me possibilitarem a frequência no mestrado, ao meu irmão, aos meus amigos, especialmente à Andreia, Ana Margarida, Ana Isabel, Ana Luísa, Cláudia, Gabriela, Susana, ao João, Luís e Rui pelos momentos de descontração e apoio nos piores momentos, e por fim, ao Frederico pelo apoio, confiança e paciência.

Resumo

O presente estudo teve como principal objectivo a determinação das vias de permeação de uma fluoroquinolona de uso veterinário, na célula bacteriana, usando como modelo mimético vesículas lipídicas (lipossomas), uma vez que as quinolonas são um dos principais grupos de antibióticos utilizados em medicina e medicina veterinária. Este estudo também teve como objectivo secundário, a comparação da enrofloxacina com uma fluoroquinolona da mesma geração, a ciprofloxacina, por estas diferirem apenas no substituinte da posição *para* do anel piperazínico.

A permeação ou interacção de antibióticos em bicamadas lipídicas é importante pois permite esclarecer a função da componente lipídica na transposição membranar das quinolonas. A determinação de coeficientes de partição entre uma fase aquosa e lipossomas (de diferente composição lipídica), num primeiro passo, permite quantificar a interacção do fármaco em estudo. No entanto, os estudos de partição não permitem determinar a localização do antibiótico quando este interage com a bicamada lipídica pelo que foi necessário recorrer a estudos de localização membranar, através da extinção de fluorescência da enrofloxacina.

Após a quantificação e localização da interacção da enrofloxacina com a componente lipídica, procedeu-se à avaliação da sua afinidade pela porina OmpF, presente na membrana externa das bactérias Gram (-), que se sabe ser uma proteína fundamental na entrada de nutrientes e antibióticos (quinolonas) para o interior da célula bacteriana. No entanto, os estudos existentes focam sobretudo a entrada destas moléculas na complexidade do ambiente microbiológico mas a sua interacção a nível molecular ainda necessita de esclarecimento.

De modo a poder determinar os diferentes locais de interacção da enrofloxacina com a porina OmpF, reconstituiu-se a proteína numa componente lipídica e procedeu-se à extinção de fluorescência, com o ião iodeto, dos triptofanos da proteína, que se sabe terem acessibilidades diferentes. A determinação, posteriormente, de constantes de associação OmpF/Enrofloxacina permitiu a quantificação da afinidade deste antibiótico para a porina, sendo assim um complemento aos estudos realizados anteriormente.

Para a reconstituição membranar foi seleccionada uma metodologia de remoção de detergente por cromatografia de exclusão, uma vez que maior parte dos estudos documentados se referem à remoção de detergente por adsorção hidrofóbica do mesmo. A aplicação desta metodologia visou a comparação em termos de tamanho,

homogeneidade e orientação da proteína, nos proteolipossomas preparados por outras metodologias de reconstituição. A reconstituição por cromatografia de exclusão constitui uma técnica simples e de rápida execução e permite a separação das estruturas (lípidio/proteína/detergente) com base no seu tamanho, a obtenção de proteolipossomas de tamanho homogéneo e uma remoção eficaz do detergente.

Os estudos efectuados revelaram que a enrofloxacinina possui uma maior afinidade para a componente lipídica do que a ciprofloxacina, provavelmente devido a um ligeiro aumento da sua hidrofobicidade pela presença de um grupo etilo no anel piperazínico.

De modo a verificar se a interacção da enrofloxacinina com bactérias Gram (-) se deve à passagem do antibiótico através do canal hidrofílico ou se aproveita, apenas, a interface lípidio/proteína para actuar realizaram-se estudos de condutividade eléctrica. Este tipo de estudos baseia-se na medição de flutuações da corrente iónica da proteína na presença de enrofloxacinina. A interrupção da corrente iónica, na presença de fármaco, associada à frequência com que as interrupções ocorrem e à concentração de antibiótico sugere a passagem do antibiótico pelo canal porínico.

Abstract

Quinolones are among the main classes of antibiotics used in human and veterinary medicine. This wide use seems to be responsible for bacteria resistance and to understand this resistance it is important to determine antibiotics permeation pathways. The main purpose of this work was to study a veterinary fluoroquinolone, in order to understand its permeation into the bacterial cell. To achieve this goal, lipid vesicles (liposomes) were used as model membranes. This work also envisaged the establishment of a comparison between Enrofloxacin and Ciprofloxacin, two second generation fluoroquinolones, since both are very similar and only differ on the *para* position of the piperazinyl ring.

The permeation or interaction of antibiotics with lipid bilayers is of great importance since it allows to clarify the function of the lipid component in the membrane permeation of quinolones. As a first approach, the determination of partition coefficients between an aqueous phase and liposomes, of different lipid composition, allows the quantification of the enrofloxacin/lipid interaction. However, partition studies are not enough to determine membranar location of the interaction therefore, fluorescence quenching studies were performed in order to define membranar location of enrofloxacin in different lipids.

OmpF porin, found in the outer membrane of gram (-) bacteria, has an important role in the uptake of nutrients and antibiotics (quinolones among others) towards the interior of the bacterial cell and several studies involving antibiotics and bacterial cells have been made, approaching the drug/protein interaction in the complex microbiological environment. Nevertheless, an understanding at a molecular level is still lacking. Thus, after quantifying the degree of interaction between enrofloxacin and the lipid phase, by means of partition and quenching studies, the affinity of this fluoroquinolone towards OmpF was investigated.

In order to establish the different enrofloxacin/OmpF interaction sites, the protein was reconstituted in a lipid bilayer. Then, quenching studies of the protein intrinsic tryptophans were performed due to their different accessibilities.

Gel-exclusion chromatography was the detergent removal methodology chosen since most of the literature reports protein reconstitutions involving hydrophobic adsorption of the detergent. The main purpose for applying this methodology was to compare size, homogeneity and protein orientation in proteoliposomes with the ones

obtained with other reconstitution techniques. Gel-exclusion is a simple and fast technique that allows separation of the different components (lipid, detergent, protein) according to their size and also produces homogenous proteoliposome populations as well as an efficient detergent removal.

The performed studies revealed a stronger affinity of enrofloxacin towards the lipid component than ciprofloxacin, probably due to the slight increase of its hydrophobicity because of the ethyl group in the piperazinyl ring of enrofloxacin. This affinity is expressed by a binding constant that represents the affinity of the drug towards the protein.

As a way to verify whether the interaction of enrofloxacin with gram (-) bacteria occurs due to the passage through the hydrophilic channel of OmpF or through the lipid/protein interface, conductivity studies were performed. This methodology is based on the observation of fluctuations in the ion current of OmpF in the presence of antibiotic. The interruption of the ion current in the presence of enrofloxacin and consequent increase of the number and frequency of these interruptions with increasing antibiotic concentration suggest that the fluoroquinolone passes through the channel.

Résumé

Les quinolones sont une classe d'antibiotiques des plus utilisés en médecine humaine et vétérinaire. Parce que cette utilisation est une des causes de résistance bactérienne ce travail a eu l'objectif de déterminer les chemins de perméation d'une fluoroquinolone vétérinaire dans la cellule bactérienne. Dans ce but, les liposomes ont été utilisés comme modèles membranaires. Ce travail a voulu aussi faire une comparaison entre enrofloxacin et ciprofloxacin, deux fluoroquinolones de deuxième génération qui se ressemblent à l'exception de la position *para* du groupe pipérazynile.

La perméation ou l'interaction d'antibiotiques avec des bicouches lipidiques est une étude importante parce qu'elle permet une compréhension des fonctions de la composante lipidique dans la perméation membranaire des quinolones. Ainsi, en une première approche la détermination de coefficients de partage entre une phase aqueuse et les liposomes de différente composition lipidique, permet la quantification de l'interaction enrofloxacin/lipide. Cependant les études de perméation ne sont pas suffisantes pour déterminer la localisation membranaire de l'interaction ainsi des études d'extinction de fluorescence ont été réalisées pour déterminer la localisation membranaire d'enrofloxacin dans différents lipides.

Il est bien reconnu que OmpF est une porine présente dans la paroi cellulaire des bactéries gram (-) et qui a un rôle important dans l'approvisionnement en nutriments et en antibiotiques (quinolones entre autres) de la bactérie. De nombreuses études impliquant des antibiotiques et cellules bactériennes ont été effectuées pour cerner l'interaction médicament/protéine dans un environnement microbiologique complexe. Néanmoins une compréhension de cette interaction au niveau moléculaire manque toujours. Après avoir quantifié l'interaction entre enrofloxacin et la phase lipidique, grâce aux mesures de coefficients de partage et des études de 'quenching', l'affinité de cette fluoroquinolone avec OmpF a été étudiée.

Dans le but d'identifier les différents sites d'interaction enrofloxacin/OmpF la protéine a été reconstituée dans une bicouche lipidique. Ensuite, des études de 'quenching' de la fluorescence intrinsèque des tryptophanes ont été effectués parce qu'ils ont différentes accessibilités. La méthodologie de reconstitution choisie est la chromatographie d'exclusion en accord avec la littérature concernant les reconstitutions de protéines impliquant l'adsorption hydrophobe de détergent. La principale raison pour appliquer cette méthodologie est la comparaison en taille, homogénéité et orientation de la protéine dans les protéoliposomes avec ceux obtenus par d'autres techniques de reconstitution.

La chromatographie d'exclusion est une méthode simple et rapide qui permet la séparation de différents composés (lipide, protéine, détergent) en rapport avec leur taille et produit également des populations homogènes de protéoliposomes et aussi une méthode d'élimination efficace de détergent.

Les études menées révèlent une affinité plus forte pour la composante lipidique d'enrofloxacin par rapport à ciprofloxacine ce qui est probablement dû à une augmentation de son hydrophobicité à cause de la présence d'un groupe éthyle sur le cycle piperazynile d'enrofloxacin. Cette affinité est représentée par une constante de liaison qui tient compte de l'affinité du principe actif pour la protéine.

Pour vérifier si l'interaction d'enrofloxacin avec les bactéries gram (-) se produit lors du passage par le canal hydrophile d'OmpF ou par l'interface lipide/protéine, des études de conductivité ont été menées. Cette méthodologie est basée sur l'observation des fluctuations du courant ionique de OmpF en présence de l'antibiotique. L'interruption de ce courant en présence de enrofloxacin et l'augmentation consécutive du nombre et de la fréquence de ces interruptions avec la concentration d'antibiotique suggère que la fluoroquinolone transite à travers le canal.

Capítulo I: Introdução Teórica

Capítulo I: Introdução Teórica

1. Quinolonas: Breve introdução e caracterização geral

As **quinolonas** fazem parte de uma família de fármacos genericamente designada por antibióticos. Actualmente são uma das maiores classes de agentes antimicrobianos e, por isso, são utilizadas, mundialmente, no tratamento de infecções de origem bacteriana e, as suas indicações terapêuticas evoluíram da aplicação a infecções urinárias a aplicações em infecções em quase todo o corpo.

As quinolonas são agentes antibacterianos sintéticos utilizados extensivamente quer em medicina como em medicina veterinária e são armas importantes no combate a organismos Gram (-), Gram (+) e as últimas gerações destes agentes chegam mesmo a ser activas contra bactérias anaeróbias.

Este grupo de fármacos foi-se desenvolvendo de forma a ultrapassar grande parte das suas adversidades possuindo, actualmente, um espectro de acção bastante mais abrangente, uma boa disponibilidade oral, uma melhor difusão para os tecidos, um tempo de semi-vida maior e uma toxicidade consideravelmente mais reduzida. Assim, tornam-se na primeira escolha no tratamento dos mais diversos tipos de infecções bacterianas não só a nível humano como também a nível veterinário.

1.1. Do Ácido Nalidíxico aos dias de hoje

As quinolonas surgiram, acidentalmente, como produto secundário da síntese de um agente antimalárico, de actividade antibacteriana conhecida e comprovada, a cloroquina. No entanto, este produto secundário revelou possuir, também, actividade antimicrobiana surgindo assim, no início da década de 60, a primeira quinolona: o Ácido Nalidíxico.^[1-3]

O Ácido Nalidíxico (1-etil-7-metil-1,8-naftiridina-4-ona-3-carboxílico) é um derivado das 1,8-naftiridinas (ou 4-quinolonas) que foi limitado, originalmente, ao tratamento de infecções urinárias devido ao seu espectro de acção modesto^[3], visto a sua acção antibacteriana contra organismos Gram (-) ser moderadamente baixa, possuir uma pobre difusão a nível dos tecidos e problemas de toxicidade a nível cardíaco e do sistema nervoso central. Assim, o uso do ácido nalidíxico rapidamente entrou em declínio devido ao crescente número de bactérias resistentes à sua actividade surgindo, deste modo, a necessidade de novos compostos para combater estas dificuldades. Embora tenha entrado em desuso, as características do ácido nalidíxico ainda estão

presentes nos novos compostos. A sua estrutura é baseada num núcleo 4-oxo-1,8-naftiridina-3-carboxilo. Devido à complexidade da nomenclatura, estes compostos são geralmente designados de 4-quinolonas (referência ao oxigénio exocíclico na posição 4). Todos os compostos, quer as naftiridonas quer as quinolonas, possuem um oxigénio exocíclico na posição 4 do anel e um grupo carboxilo na posição 3 para os quais foi detectada actividade antibacteriana. [2]

Por alterações à sua estrutura base, como a inserção de átomos de azoto nas posições 1 e 8, de aminas cíclicas na posição 7, ou de grupos alquilo como substituintes em N-1, outras quinolonas de 1ª geração como o ácido oxalínico, a cinoxacina ou o ácido pipemídico foram surgindo mas, estas novas quinolonas, embora revelassem uma actividade antibacteriana ligeiramente superior para Gram (-) esta não era suficientemente significativa comparativamente ao Ácido Nalidíxico. [1, 3, 4, 5]

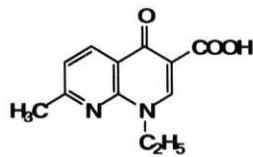


Figura 1 – Núcleo base das 4-oxo-1,4-dihidroxiquinolonas vs estrutura do Ácido Nalidíxico.

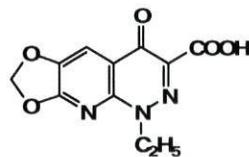
A actividade das quinolonas aumentou, consideravelmente, por adição de um átomo de flúor na posição 6 do núcleo das quinolonas, dando origem a uma nova classe de compostos designada de fluoroquinolonas (quinolonas de segunda geração). No entanto, é importante referir que, embora se denominem (fluoro)quinolonas, quando na posição 8 do núcleo base se encontra um átomo de azoto as quinolonas são naftiridonas e só são, verdadeiramente, fluoroquinolonas (ou quinolonas) quando na posição 8 se encontra um átomo de carbono. [1, 2]

A figura 2 representa a classificação das quinolonas nas várias gerações, com base no seu espectro de acção.

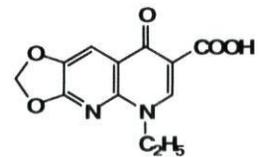
1ª Geração



Ácido Nalidíxico

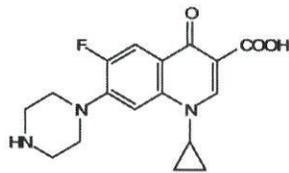


Cinoxacina

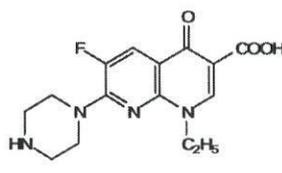


Ácido Oxalínico

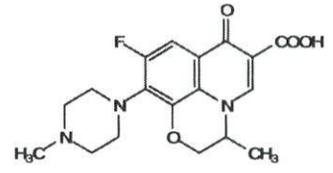
2ª Geração



Ciprofloxacina

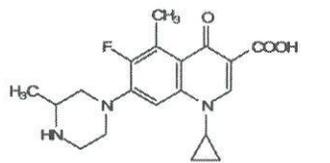


Norfloxacina

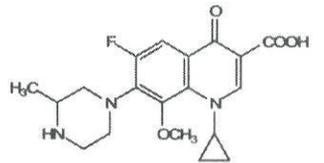


Ofloxacina

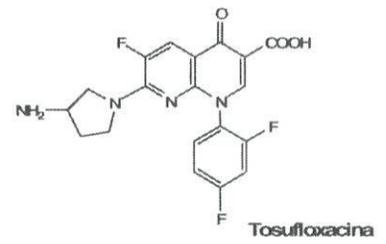
3ª Geração



Grepafloxacina

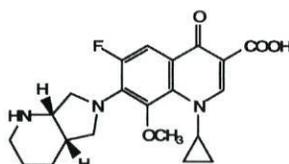


Gatifloxacina

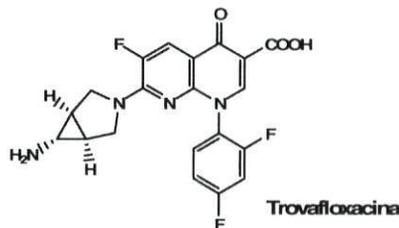


Tosufloxacina

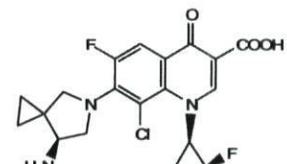
4ª Geração



Moxifloxacina



Trovafloxacina



Sitafloxacina

Figura 2 – Evolução das quinolonas: as diferentes gerações, baseada na referência [1].

As diferentes alterações tiveram como intenção a criação de compostos com um maior espectro de acção, melhor farmacocinética, menor nível de toxicidade e, que conseguissem ultrapassar a oferta de resistência dos diferentes microrganismos. No entanto, alterações nas posições **2**, **3**, **4** e **6** não são possíveis, uma vez que levam à perda da actividade da molécula. Na posição **2**, qualquer grupo maior que um átomo de hidrogénio pode criar interacções estereoquímicas com os grupos na posição **3** e **4** onde se encontram os grupos oxo e carboxilo, fundamentais para a actividade antibacteriana e que por esse motivo também não podem sofrer alterações. Na posição **6**, encontra-se um átomo de flúor que é um elemento fundamental para a potência, a nível de actividade, do composto. [2]

Como já foi referido, o aumento da actividade antimicrobiana das quinolonas, ao longo das diversas gerações, deve-se a alterações feitas à estrutura base das quinolonas (anel 4-quinolona). [6]

1.1.2. As Fluoroquinolonas

Os primeiros compostos de segunda geração surgiram na década de 80, com a combinação de um átomo de flúor (posição 6) e um grupo piperazinil (posição 7) (norfloxacin, ciprofloxacina, ofloxacina). Esta combinação levou a um maior espectro de acção (passou a incluir *Pseudomonas* spp), a um aumento da capacidade das quinolonas penetrarem na parede bacteriana levando, conseqüentemente, a uma melhor actividade contra bactérias Gram (-), passando a abranger, também, algumas espécies Gram (+) e, atingiu um perfil farmacocinético melhor, chegando a ter um actividade antibacteriana 1000 vezes superior à observada pelo ácido nalidíxico. [2, 7] A adição de grupos alquilo na posição *para* do anel piperazínico e no azoto na posição 1 aumenta a lipossolubilidade e o volume de distribuição dos compostos. [6] Destas fluoroquinolonas, as mais utilizadas são a ciprofloxacina e a ofloxacina no entanto, a ciprofloxacina é mais activa contra *Pseudomonas aeruginosa* e a primeira quinolona a ser utilizada em diversas infecções e não ser, apenas, limitada ao uso em infecções urinárias ou sexualmente transmissíveis. [1,5]

A actividade contra bactérias Gram (+) aumentou, significativamente, com a terceira geração (grefloxacina, gatifloxacina, temafloxacina) e uma maior actividade contra bactérias anaeróbias permitiu distinguir parte destes novos compostos numa quarta geração de quinolonas (moxifloxacina, trovafloxacina). A vasta pesquisa feita nesta área permitiu uma melhor definição das alterações ao núcleo base das quinolonas

que oferecem uma maior eficácia clínica, resistência e toxicidade reduzida. Tais alterações incluem um grupo ciclopropil na posição 1, um grupo metoxi na posição 8, um substituinte na posição 7 como um grupo piperazina ou pirrolidina e um átomo de flúor na posição 6. No entanto, a remoção do átomo de flúor na posição 6 (suspeito de provocar genotoxicidade e defeitos a nível do sistema nervoso central) deu origem a quinolonas designadas de des-fluoroquinolonas, sendo o primeiro composto desta geração a garenoxacina. [5]

As fluoroquinolonas são os únicos agentes antibacterianos a competir com os antibióticos β -lactâmicos (amoxicilina, cefalosporinas) a nível do seu impacto na utilização clínica no campo antibacteriano. Existe, actualmente, um enorme número de novas fluoroquinolonas e as modificações estruturais efectuadas permitiram que esta classe de antibióticos se desenvolvesse drasticamente, desde os primeiros compostos sintetizados (com aplicação limitada) até aos novos compostos, cujo maior espectro de acção e farmacocinética permitem uma única dosagem diária.

1.1.2.1. Propriedades físico-químicas

As fluoroquinolonas, como já foi referido, pertencem a uma classe de agentes antibacterianos com um largo espectro de actividade contra organismos Gram (+) e Gram (-), assim como organismos anaeróbios e, a sua acção terapêutica é fundamental sobretudo em infecções causadas por organismos resistentes a outras classes de fármacos. [2, 7]

Deste modo, as propriedades físico-químicas das quinolonas vão influenciar o comportamento destas tanto *in vivo* como *in vitro*, especialmente as suas propriedades ácido/base, capacidade para complexar iões metálicos, assim como o seu carácter hidro/lipofílico. [8-10]. É importante mencionar que, a actividade antibacteriana das quinolonas depende fortemente do pH do meio em que se encontram, visto actuarem por inibição da DNA girase (enzima alvo destes fármacos) e este é um processo que depende do pH e concentração de ácido. [6]

A presença de um grupo ácido (grupo carboxilo) e de um grupo básico (amina terciária) atribui ao composto propriedades anfotéricas podendo, deste modo, existir mais do que uma espécie presente em solução, dependendo do pH, devido à protonação/desprotonação destes grupos influenciando assim, o comportamento farmacológico destes compostos, uma vez que a presença de grupos carregados é necessária para a actividade biológica. [10, 11] Dependendo do pH a que se encontra o

meio, as quinolonas podem existir sob as formas catiónica, aniónica, neutra ou de ião-dipolar (zwitteriónica). A pH 7,4 (fisiológico) as quinolonas encontram-se total ou parcialmente ionizadas, sendo a espécie predominante a forma de ião dipolar podendo, no entanto, coexistir com as formas aniónica e catiónica. [9, 11]

Avaliando as constantes de acidez para as diferentes quinolonas verifica-se que, embora as diferenças entre elas sejam pequenas e exista uma similaridade entre elas, essas pequenas diferenças são suficientes para influenciar as espécies que estarão presentes a pH fisiológico. No caso da Enrofloxacinina, é possível verificar que esta, a pH 7,4 se encontra 92% na forma de ião dipolar, 4% na forma aniónica e 4% na forma catiónica. [12] No entanto, a Ciprofloxacina, que difere apenas da ENR pela presença de um átomo de hidrogénio na posição *para* no anel piperazínico, em vez de um grupo etilo, já se encontra 90% na forma de ião dipolar e 10% na forma aniónica.

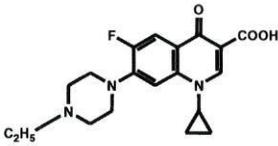
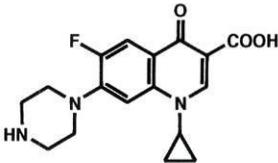
Quinolona	PM (g.mol ⁻¹)	pKa ₁	pKa ₂	Espécies presentes a pH fisiológico
Enrofloxacinina 	359,40	6,12±0,05	7,68±0,42	92% Ião dipolar 4% Aniónica 4% Catiónica
Ciprofloxacina 	331,35	6,15±0,15	8,66±0,11	90% Ião dipolar 10% Aniónica

Tabela 1 – Valores de pKa₁ e pKa₂ associados às constantes de dissociação e propriedades físico-químicas para a Enrofloxacinina e Ciprofloxacina. [13]

De acordo com as constantes de acidez e diferentes estruturas (diferentes substituintes) as quinolonas vão exibir diferentes acções antibacterianas. Sendo as porinas uma das principais vias de entrada das quinolonas nas células bacterianas Gram (-), a hidrofobicidade, peso molecular, e a forma iónica a pH fisiológico são propriedades que vão complicar a interacção destes fármacos. No caso das bactérias Gram (+), como estas não possuem uma membrana externa, onde se encontram os canais porínicos, a difusão através da membrana celular será o local de entrada dos

antibióticos na célula bacteriana e neste caso, a hidrofobicidade do composto é a propriedade mais importante.^[12]

1.3. Mecanismo de acção e resistência

1.3.1. Mecanismo de acção

As quinolonas actuam por inibição da actividade catalítica de duas enzimas responsáveis e essenciais à replicação e transcrição do DNA bacteriano: a DNA girase e a topoisomerase IV (topoisomerasas do tipo II).^[1, 14, 15]

Na sua forma relaxada, o DNA existe como uma dupla hélice que pode ser enrolada, e torcida, no sentido contrário ao da hélice, o que leva a um superenrolamento da dupla hélice.^[14] Para que haja replicação é necessário que as duas cadeias se separem, ou seja, é importante que a dupla hélice se desenrole. O grau de enrolamento do DNA depende da acção combinada superenrolamento/relaxamento das duas enzimas. A DNA girase é responsável pelo superenrolamento negativo enquanto que a topoisomerase IV o remove promovendo o relaxamento da molécula de DNA.^[16] Uma vez que ambas as enzimas são essenciais ao crescimento e divisão das células bacterianas, ao bloquearem a acção destas enzimas inibem todos os processos consequentes da sua acção levando, assim, à morte da célula bacteriana.

O modo como as quinolonas acedem ao local onde irão actuar é determinante para a sua acção antibacteriana. No caso das bactérias Gram (-), a membrana externa é a principal barreira à entrada destes antibióticos na célula bacteriana. Vários estudos afirmam o local de acção das quinolonas é intracelular^[17] e portanto os fármacos penetrarão a membrana externa através das proteínas transmembranares OmpF e OmpC.^[18] Estes estudos, realizados com estirpes mutantes nestas porinas, evidenciam um aumento da resistência às quinolonas mas também, que a entrada destes fármacos nas células não será feita apenas através de porinas mas também por vias adicionais.^[18, 19]

De acordo com a estrutura base das quinolonas, existem dois grupos carbonilo adjacentes, pertencentes ao grupo carboxilo e oxo nas posições 3 e 4, que constituem potenciais locais de complexação de iões divalentes. Assim, existe a possibilidade das quinolonas interagirem com a membrana externa da célula bacteriana como agentes quelantes dos iões magnésio aí presentes. Estes iões ligam moléculas de lipopolissacarídeo entre si impedindo a entrada dos fármacos na célula. As quinolonas, ao complexarem estes catiões vão destabilizar a estrutura da membrana externa

expondo, deste modo, locais da bicamada lipídica por onde os antibióticos se podem difundir. Esta via de permeação é denominada de via autopromovida. [1, 18]

1.3.2. Mecanismos de resistência

Os mecanismos de resistência desenvolvidos por bactérias à acção antibacteriana das quinolonas ocorrem por dois mecanismos fundamentais:

1. Alterações nas moléculas alvo: as enzimas DNA girase e topoisomerase IV;
2. Alterações a nível da acumulação intracelular dos antibióticos.

Uma acumulação intracelular reduzida pode dever-se a uma diminuição da permeabilidade da membrana externa do fármaco pelo facto das proteínas membranares (porinas) sofrerem alterações que afectam a sua expressão ou pela estimulação dos sistemas de efluxo celular que leva à expulsão da droga de célula por transporte activo. [1, 5, 14, 15, 20]

Devido ao uso excessivo das quinolonas, o aparecimento de resistências bacterianas fez com que fosse necessário apresentar novas estruturas que possuíssem um espectro de acção maior e que actuassem nas estirpes resistentes. Estas alterações estruturais, provavelmente, influenciam as propriedades físico-químicas dos antibióticos que por sua vez estarão relacionadas com a maior actividade antibacteriana que as gerações mais recentes apresentam.

1.4. Fluoroquinolonas e Medicina Veterinária

1.4.1. Enrofloxacin e Enrofloxacin vs Ciprofloxacin

A enrofloxacin é uma fluoroquinolona de 2ª geração eficaz no tratamento das principais infecções bacterianas que afectam animais de quinta (gado, suínos, aves) por possuir um espectro de acção que inclui bactérias Gram (-) e Gram (+). [12] As suas propriedades físico-químicas são idênticas às observadas para as fluoroquinolonas: um átomo de flúor na posição 6 que permite eficácia no combate a bactérias Gram (-) e que permitiu o alargamento do seu espectro de acção de modo a abranger bactérias Gram (+), o anel piperazínico na posição 7 que aumenta a sua actividade antibacteriana, especialmente para *Pseudomonas* spp e os grupos carbonilo adjacentes, nas posições 3 e 4, fundamentais para a actividade antibacteriana e complexação da enzima DNA girase.

A enrofloxacin e a ciprofloxacina são duas quinolonas de 2ª geração sensivelmente iguais em termos de estrutura molecular, como se pode observar na figura 3, porém, a primeira possui um grupo etilo como substituinte na posição *para* do anel piperazínico. Este substituinte confere-lhe uma maior lipofilicidade aumentando deste modo a sua penetração nos tecidos, além de diminuir a toxicidade a nível do Sistema Nervoso Central (SNC).^[21]

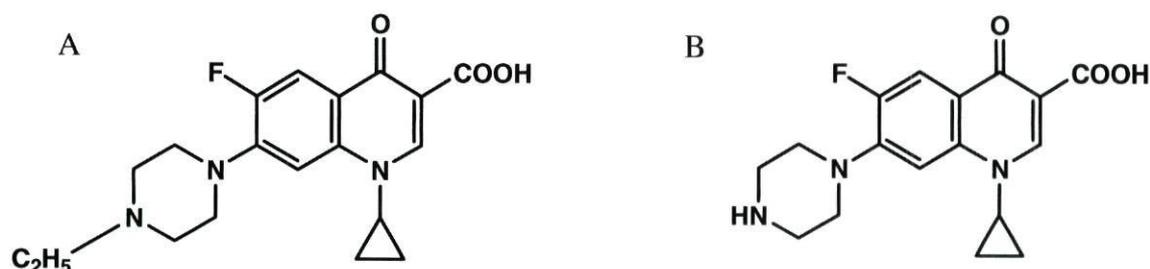


Figura 3 – Estrutura molecular da Enrofloxacin (A) vs Ciprofloxacina (B).

As diferenças estruturais vão, também, influenciar as propriedades físico-químicas destas fluoroquinolonas como as propriedades ácido-base (na tabela 1), coeficientes de partição ou mesmo localização membranar.

1.4.2. Fármacos de uso Veterinário: Influência a nível alimentar

Entende-se por fármaco de uso veterinário qualquer substância aplicada ou administrada a qualquer animal para consumo. Estes fármacos, têm como objectivo manter ou melhorar a saúde de animais utilizados na alimentação humana. Os animais, para os quais está aprovado o uso de fármacos veterinários, incluem gado, suínos, ovinos, caprinos, aves domésticas e peixes.

Actualmente, existe uma vasta variedade de antibióticos e aditivos alimentares utilizada tanto para efeitos terapêuticos como na prevenção de doenças em animais para consumo. A elevada produção/criação de animais em países desenvolvidos, levou a um aumento substancial do uso de medicamentos de uso veterinário assim como do uso destes como promotores de crescimento. Consequentemente, a preocupação com a saúde pública devido às diferentes utilizações destes medicamentos em medicina veterinária e à presença de resíduos desses medicamentos em alimentos de origem animal também cresceu significativamente.^[22, 23]

Para além de serem usados na prevenção de doenças e no crescimento, os antibióticos podem, ainda, ser utilizados para retardar a degradação, aumentar a validade e estabilidade de produtos de origem animal.

A segurança do consumidor é de extrema importância quando os animais em causa foram tratados com fármacos porque, enquanto a administração de qualquer medicamento nos humanos é feita por vontade própria, o mesmo não acontece quando resíduos destes se encontram nos alimentos ingeridos e, uma vez que a ingestão dos fármacos não é controlada, esta pode contribuir para o aumento da resistência a esses medicamentos por parte dos humanos, como se tem vindo a verificar com os antibióticos.

Recentemente têm adquirido resistência, à Ciprofloxacina, mais estirpes de *Salmonella hader* do que qualquer outra *Salmonella* spp. É possível que o uso abusivo de Enrofloxacina, a nível veterinário, tenha resultado na persistência e propagação de *Salmonella* spp. resistente à Ciprofloxacina em animais para consumo uma vez que esta última, em determinadas condições, pode ser um produto da degradação da Enrofloxacina. [22, 23]

1.4.2.1. Uso de quinolonas em animais na perspectiva da segurança alimentar

O desenvolvimento de resistências bacterianas é um dos maiores problemas no uso de antibióticos em animais. Várias sondagens, a nível europeu, demonstraram que a resistência antimicrobiana se desenvolveu, lentamente, com a aprovação de quinolonas para uso animal. [6]

Uma grande variedade de antibióticos é utilizada na produção de gado e o seu uso leva, inevitavelmente, à selecção de bactérias resistentes no ecossistema onde são utilizados. [24] O uso de agentes antimicrobianos em medicina veterinária foca, sobretudo, o tratamento e/ou prevenção de doenças nos animais porém, a questão fundamental é se, efectivamente, os antibióticos utilizados em veterinária seleccionam bactérias resistentes que possam ser transferidas para os humanos através da ingestão de alimentos ou água. [25]

É do conhecimento público que a administração oral de pequenas concentrações de antibiótico, por longos períodos de tempo, aumenta o peso e reduz o aparecimento de doenças associadas ao stress, devido ao transporte, em animais para consumo. Enquanto que a maioria da resistência bacteriana observada em medicina se deve a uma prescrição

inapropriada de antibióticos aos pacientes, pressupõe-se que o uso em medicina veterinária e agricultura contribui, no caso de alguns agentes bacterianos, para o problema em causa. [25]

O uso de quinolonas na produção de gado tem vindo a ser uma área, particular, de preocupação devido ao significado que esta família de agentes antimicrobianos tem no tratamento de uma vasta gama de infecções em humanos, incluindo infecções gastrointestinais provocadas por bactérias zootónicas transmitidas a humanos através da cadeia alimentar. [24] O seu uso em animais para consumo resultou num substancial aumento do número de bactérias resistentes a estes antibióticos nos animais e nos alimentos provenientes destes. A FDA (Food and Drug Administration) banuiu, recentemente, a utilização da enrofloxacin em animais de aviário devido ao rápido crescimento de resistência à ciprofloxacina, em humanos infectados por *Campylobacter*.

As fluoroquinolonas possuem uma boa biodisponibilidade oral e penetram bem em quase todos os tecidos pelo que no passado, estes fármacos eram eficazes contra quase todas as infecções provocadas por bactérias Gram (-) e são usadas, frequentemente, no tratamento de infecções por *E.coli*.

No entanto, o aumento de resistência, por parte de *E.coli* às fluoroquinolonas ameaça aumentar a mortalidade, morbidade e, provavelmente surgiu como consequência do seu uso em humanos ou em animais. Estudos realizados e documentados apontam o uso de fluoroquinolonas em animais como motivo para a emergência e disseminação de *E.coli* resistente a quinolonas. [26]

1.5. Estudo da interacção de quinolonas com modelos biomembranares

A entrada das quinolonas nas células bacterianas e o seu percurso até ao local de acção é um passo fundamental na actividade antibacteriana. A utilização de modelos membranares, como lipossomas ou proteolipossomas, cuja estrutura e composição são conhecidas e semelhantes às membranas celulares, permite o conhecimento e esclarecimento do mecanismo de entrada das quinolonas na célula bacteriana.

Os modelos membranares, como os lipossomas, permitem a determinação de coeficientes de partição e conseqüentemente uma avaliação da permeação do fármaco na membrana celular enquanto que os proteolipossomas, onde foi inserida uma proteína membranar, permitem avaliar a via de entrada da quinolona na célula. Actualmente são propostas três vias de entrada das quinolonas nas células bacterianas:

1. Via hidrofílica – a permeação na membrana é feita pelo interior dos canais porínicos através de porinas, constituídas por proteínas membranares;
2. Interface Lípido/Proteína;
3. Via hidrofóbica – difusão através da bicamada fosfolipídica.

O estudo da permeação e localização da Enrofloxacina em sistemas miméticos de membranas celulares (lipossomas e proteolipossomas) permite abordar a interação da quinolona com uma componente lipídica, no caso dos lipossomas, e deste modo avaliar o seu nível de permeação por difusão. Estudos realizados com proteolipossomas, por sua vez, possibilitam a determinação da influência dos canais porínicos no acesso destes fármacos às suas estruturas alvo.

A compreensão deste mecanismo de entrada fornece informações importantes no combate à resistência bacteriana às fluoroquinolonas e também, em termos de segurança alimentar, o conhecimento do nível de permeação do antibiótico nas células, quando estes não são utilizados devidamente (promotores de crescimento), é possível determinar o tempo necessário para que o fármaco saia do sistema de modo a não existirem resíduos, aquando do abate, que possam ser transferidos, posteriormente, nos alimentos aos humanos.

2. Estrutura bacteriana

2.1. Caracterização geral

As bactérias são organismos procarióticos cujas células possuem dimensões entre 0,3 e 5µm e podem adoptar várias formas e estruturas.

Nas células procariotas, o DNA consiste numa dupla hélice circular que se encontra compactada no citoplasma bacteriano. Todas as células possuem uma membrana celular (membrana plasmática), que separa a célula do exterior e a protege contra danos mecânicos e substâncias nocivas impedindo a sua entrada. Esta membrana consiste numa dupla camada de lípidos, na qual se encontram presentes uma vasta diversidade de moléculas proteicas. Os poros e canais de transporte permitem a selecção ou expulsão das substâncias presentes no meio em que se encontram. ^[27]

As bactérias possuem, ainda, uma parede celular cuja função é a de protecção, contra o ambiente hipotónico em que se desenvolvem, e manutenção da pressão osmótica entre o ambiente intracelular e o extracelular. Deste modo, a parede celular é

uma protecção mecânica que, devido à sua rigidez, é responsável pela morfologia da célula.

Algumas bactérias podem ser classificadas em Gram (-) e Gram (+). A coloração de Gram é um método que permite distinguir estas bactérias, com base na composição da sua parede celular. A parede celular das bactérias Gram (+) é constituída por uma única membrana e o seu constituinte principal é o peptidoglicano (heteropolímero rígido e insolúvel em água constituído por cadeias lineares de N-acetilglucosamina e ácido N-acetilmurâmico). Em contraste, a parede celular das bactérias Gram (-) é constituída por duas membranas (uma interna e uma externa). A membrana externa é constituída por várias proteínas e lipopolisacarídeo (macromolécula) enquanto que a membrana interna é fundamentalmente constituída pelo peptidoglicano. [28]

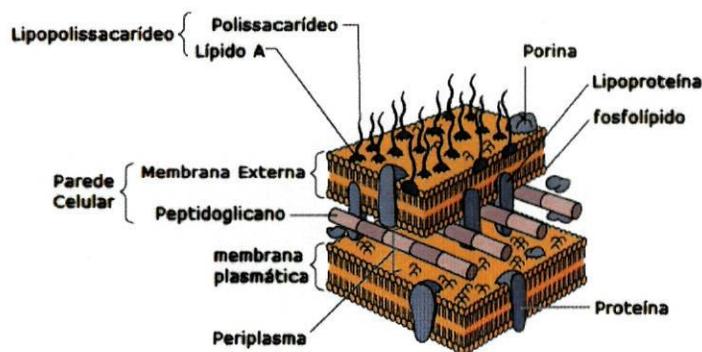


Figura 4 – Representação esquemática da parede celular de uma bactéria Gram (-). (Adaptado de: <http://diverge.hunter.cuny.edu/~weigang/Lecture-syllabus.html>).

2.2. Membrana Externa da Bactérias Gram (-)

As bactérias Gram (-), como já foi referido, possuem duas membranas lipídicas concêntricas. A membrana externa é acentuadamente assimétrica pois a composição do seu folheto interno (de igual composição à membrana citoplasmática, ou seja, à membrana interna) difere da composição do folheto externo. O folheto interno da membrana externa de bactérias Gram (-) é fundamentalmente constituído por fosfolípidos (74% fosfatidiletanolamina, 3% de cardiolipina e 19% fosfatidilglicerol) [29] enquanto que o seu folheto externo é essencialmente constituído pelo lipopolisacarídeo (LPS), embora também esteja presente uma pequena percentagem de fosfatidilglicerol. [29] O LPS é constituído por uma parte lipídica que se designa lípido A (região hidrofóbica) que é responsável pela ancoragem do LPS à membrana externa, e por uma cadeia polissacarídea (região hidrofílica) que se estende para o exterior da célula

bacteriana. [28] Moléculas de LPS adjacentes ligam-se entre si através da complexação de catiões divalentes e a componente lipídica é sobretudo composta de hidrocarbonetos saturados o que torna a membrana externa uma estrutura mais rígida formando, deste modo, uma barreira contra a penetração de antibióticos ou outro tipo de agentes. [30, 31]

Além da componente lipídica, a membrana externa também possui uma componente proteica. 50% do peso total da membrana deve-se à presença de numerosas proteínas [32] quer na forma de proteína integrais, porinas, enzimas ou na forma de lipoproteínas. [33]

As porinas são constituídas por canais hidrofílicos (poros) e constituem o principal grupo de proteínas (10^5 porinas por bactéria) responsável pela difusão de solutos (de baixo peso molecular) através da membrana externa. [32, 34] As dimensões destes canais encontram-se, aproximadamente, entre 36000-38000 Dalton. [35, 41]

As proteínas transmembranares (porinas) podem ser divididas em duas categorias:

- Porinas gerais, ou não específicas, que permitem a passagem de solutos e iões de pequena massa molecular sem elevada especificidade (embora demonstrem uma pequena selectividade para catiões – OmpF e OmpC – ou aniões – PhoE);

- Porinas específicas, que possuem um local de ligação dentro do canal que permite a difusão facilitada de solutos específicos (como o caso de LamB uma proteína específica na passagem de maltooligossacarídeos pelo seu canal). [35]

OmpF pertence à classe das porinas não específicas pelo que só permite a passagem de solutos de peso molecular inferior a 600Da e que possui, como já foi referido, uma ligeira selectividade catiónica.

2.3. Proteína F da Membrana Externa (OmpF)

2.3.1. Caracterização geral

OmpF é uma das principais porinas gerais. Estas porinas são conhecidas por formarem homotrimeros na membrana externa. Cada monómero é constituído por uma cadeia polipeptídica de 340 aminoácidos que se organizam numa estrutura em barril β constituída por 16 folhas β pregueadas antiparalelas orientadas entre 30 e 60° relativamente ao eixo do trímero. [36-38]

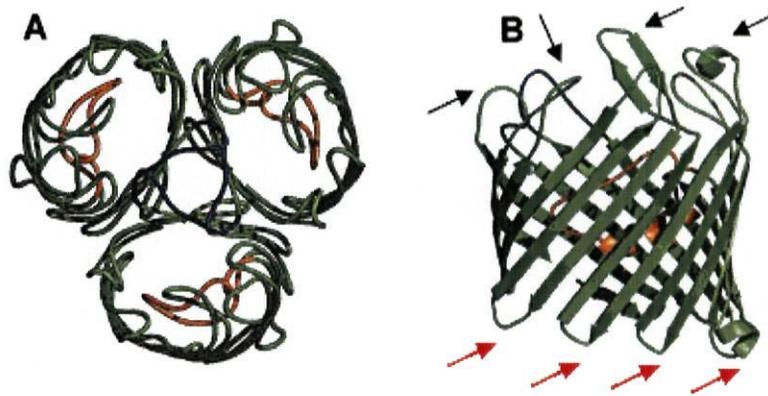


Figura 5 – Representações esquemáticas da estrutura de OmpF. A) Organização de OmpF em trímico (estrutura quaternária) vista do topo da membrana (lado extracelular). B) Organização estrutura do monómero (estrutura terciária) no plano membranar. ^[38]

Os trímeros são formados por interações hidrofóbicas entre as cadeias laterais das folhas β . As 16 folhas pregueadas β encontram-se ligadas entre si através de ansas (“loops”). As ansas orientadas para a zona periplásmica (figura 5B setas vermelhas) são 7 e são curtas (1 a 4 resíduos) enquanto que as ansas que ligam as folhas β , na zona extracelular (figura 5B setas pretas) são 8 e geralmente mais longas. ^[38, 39, 40] Das ansas presentes em OmpF, existem duas, L_2 e L_3 , com características específicas na função e estabilização da molécula. L_2 é responsável pela interação entre monómeros adjacentes fornecendo uma elevada estabilidade ao trímico, enquanto que L_3 , sendo especialmente longa (33 resíduos de aminoácidos), não se expõe à superfície celular mas sim, dobra-se para o interior do canal dando origem a uma zona de constrição situada aproximadamente a meio do poro (altura/2). Esta disposição estrutural confere à proteína uma forma de ampulheta com dimensões de $7 \times 11 \text{ \AA}$ na zona de constrição e $15 \times 22 \text{ \AA}$ na zona periplásmica. ^[36, 38]

2.3.2. Selectividade iónica

Embora OmpF não seja uma porina específica, ou seja, selectiva quanto ao soluto que permeia cada um dos seus monómeros, as suas restrições estruturais vão influenciar a passagem de determinados solutos. A presença das ansas, na estrutura de OmpF, vai não só, por si, estreitar o poro à entrada mas a presença das cadeias laterais dos aminoácidos presentes na ansa L_3 e na estrutura do monómero vão provocar um estreitamento ainda maior. ^[36] Assim, as características do canal hidrofílico como a

selectividade iónica e exclusão de tamanho, são definidas pelas propriedades dos aminoácidos laterais que se estendem para o interior do poro. ^[36]

Os resíduos carregados positiva e negativamente na zona de constrição estão dispostos assimetricamente. ^[37] Devido às forças electrostáticas, as cadeias laterais dos aminoácidos envolvidos estão estendidas ao máximo, o que leva a que a porina tenha uma forma rígida definida, requisito necessário para excluir, eficazmente, solutos que excedam o peso molecular limite (~600Da). ^[35] Estas forças electrostáticas também tornam a entrada de solutos apolares energeticamente desfavorável. ^[40]

Os resíduos de aminoácidos presentes em L₃, são determinantes nas propriedades que estabelecem o tamanho e carga dos solutos que permeiam a porina que podem ser alterados por modificação da sua sequência. Em estudos com mutantes de OmpF ^[30, 37, 41] a substituição de Asp113 por Gly, influencia fortemente a selectividade iónica da porina pois verifica-se que esta alteração torna a selectividade catiónica da porina quatro vezes menor à da proteína nativa. ^[42] Deste modo, é possível afirmar que a selectividade catiónica de OmpF se deve à presença de aminoácidos carregados negativamente no interior ou próximo da abertura do canal. ^[43]

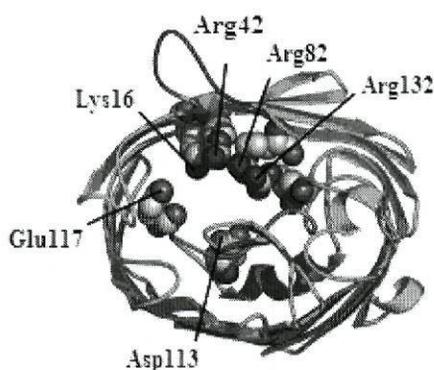


Figura 6 – Zona de constrição de OmpF (vista de topo, perpendicularmente à membrana). A zona de constrição é constituída pelos resíduos ácidos Glu117 e Asp113 (provenientes de L₃ e carregados negativamente) e por quatro resíduos pertencentes à estrutura do barril β , opostos a L₃, Lys16, Arg42, Arg82, Arg132.

A zona de constrição da porina OmpF é delimitada, por um dos lados, pela cadeia principal de grupos carbonilo e cadeias laterais do aminoácido ácido aspártico e ácido glutâmico, presentes na ansa L₃ e, do lado oposto, pelas cadeias laterais dos aminoácidos arginina e lisina presentes na estrutura de barril β da porina. ^[36]

2.3.3. Propriedades físico-químicas

2.3.3.1. Estabilidade

Os trímeros que constituem OmpF são bastante estáveis pois a proteína mantém-se na sua conformação nativa mesmo quando sujeita a temperaturas elevadas, à presença de agentes desnaturantes (solução 2% SDS a 70°C), sais caotrópicos (5M Cloreto de Guanidínio), de proteases, solventes orgânicos e ainda num intervalo de pH bastante largo. ^[44, 33] Estas propriedades tornam-se fundamentais para a sobrevivência das células bacterianas dentro do tracto gastrointestinal do hospedeiro ^[45]

A estrutura tridimensional da proteína também vai influenciar a sua estabilidade. Na conformação em barril β , os aminoácidos encontram-se dispostos antiparalelamente (em sentidos contrários no caso específico de OmpF) e ligam-se entre si através de pontes de hidrogénio formadas entre os grupos amino e carbonilo pertencentes segmentos polipeptídicos adjacentes. ^[27] O estabelecimento de ligações de hidrogénio entre L₃ e a parede da proteína, as interacções polares e electrostáticas entre a extremidade de L₃ e o barril β , e as ligações polares e iónicas entre monómeros, providenciadas por L₂, contribuem, ainda, para uma maior estabilidade da porina. ^[44]

2.3.3.2. Propriedades espectroscópicas

As proteínas, como já foi referido, são constituídas por cadeias polipeptídicas. Cada cadeia polipeptídica é composta por uma sequência de aminoácidos, dentro dos quais se encontram o triptofano (Trp), a tirosina (Tyr) e a fenilalanina (Phe). Os aminoácidos referidos são conhecidos por possuírem uma fluorescência intrínseca, visto serem compostos aromáticos, como se pode observar na figura 7. No entanto, a grande parte da fluorescência emitida por proteínas provém do triptofano, enquanto que as emissões de tirosina e fenilalanina são bastante menores.

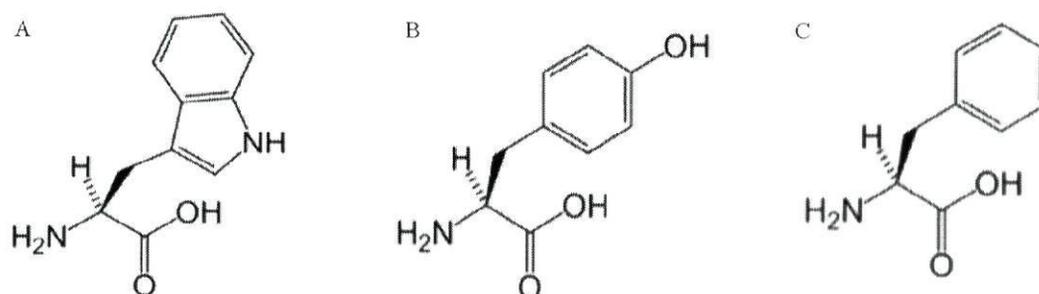


Figura 7 – Aminoácidos, presentes em OmpF, que possuem Fluorescência: (A) Triptofano, (B) Tirosina e (C) Fenilalanina.

OmpF possui dois triptofanos por cada monómero, um na posição 61 e outro na posição 214. O Trp⁶¹ encontra-se na interface entre os monómeros enquanto que o Trp²¹⁴ se encontra na interface lípido/proteína, ou seja, num ambiente mais hidrofílico. [47, 48] Estudos com mutantes de OmpF, onde se efectuou a substituição de um ou outro resíduo de triptofano, evidenciaram que a emissão de fluorescência por parte de Trp⁶¹ ocorre a um comprimento de onda de emissão mais baixo do que para Trp²¹⁴ e, uma vez que os comprimentos de onda de emissão de Trp geralmente decrescem quanto menor for a polaridade ambiental, este comportamento sugere que Trp⁶¹ se encontra num ambiente muito hidrofóbico. [46]

Embora OmpF possua um elevado número de resíduos de tirosina por monómero (29 resíduos de tirosina) a fluorescência de OmpF reflecte maioritariamente a contribuição dos triptofanos pois a fluorescência proveniente dos resíduos de tirosina se encontra extinta, provavelmente, devido a interações com a cadeia peptídica ou transferência de energia para o triptofano. [46, 48]

3. Modelos Membranares

O estudo de modelos membranares experimentais, ou seja, modelos que mimetizam as membranas celulares, é fundamental na compreensão da relação estrutura-actividade demonstrada pelas membranas biológicas. [49]

Além da água, e juntamente com as proteínas, os ácidos nucleicos e os carboidratos, os lípidos são biomoléculas essenciais na estrutura e função da matéria viva, sendo os lípidos predominantes os triglicéridos, geralmente designados como gorduras, e as ceras. Embora estes lípidos sejam fundamentais no fornecimento de energia para o metabolismo celular, no que diz respeito aos modelos biomembranares, os lípidos de maior interesse são os que possuem características anfifílicas por serem os blocos construtores das membranas celulares. [50] Estudos realizados sobre as propriedades físico-químicas dos lípidos, levaram à conclusão que as membranas celulares são compostas por uma bicamada fosfolipídica contínua.

Os lipossomas exibem muitas das propriedades das membranas celulares, como a discriminação de iões ou resposta a uma variedade de agentes fisiológicos e farmacêuticos, o que os torna um modelo membranar valioso no estudo das propriedades das membranas biológicas, que poderão ser dependentes da sua composição lipídica o que leva a serem bastante utilizados no estudo das propriedades membranares. [51] Com efeito, eles constituem um modelo membranar que tenta

reproduzir a estrutura e propriedades das membranas biológicas. A principal vantagem da sua utilização é a possibilidade de modular as condições experimentais de modo a evidenciar a influência de determinados factores nas suas propriedades membranares, como a composição lipídica, a temperatura, a força iónica, assimetria lipídica e pH do meio em que se encontram. A maior parte das técnicas desenvolvidas são de aplicação a nível dos estudos biomembranares e dão informações ao nível da permeabilidade, fluidez ou organização das vesículas. ^[52]

3.1. Lipossomas

A estrutura dos lipossomas é consistente com as principais funções das membranas biológicas pois, definem tamanho e forma de células ou organelos, estabelecem uma barreira de permeabilidade e são um suporte bidimensional no qual se encontram inseridas proteínas que possuem diferentes funções.

Os lipossomas são definidos como estruturas esféricas (vesículas) compostas por uma bicamada fosfolipídica, que encerra no seu interior um determinado volume de solução aquosa. Uma das maiores vantagens da aplicação de lipossomas como modelos miméticos de biomembranas é o facto dos lípidos que os constituem poderem ser de origem natural, ou sintética, de modo a serem idênticos à membrana celular que se pretende estudar. Estes lípidos podem conter ainda na sua composição componentes membranares como o colesterol. ^[53]

O tamanho das vesículas lipossómicas está compreendido entre 20nm até dezenas de micrómetros. No entanto, as suas dimensões dependem do método utilizado para preparar os lipossomas. Uma vez que lipossomas de diferentes tamanhos, geralmente, necessitam de diferentes métodos de preparação e porque as diferentes aplicações dos lipossomas requerem determinadas dimensões para os lipossomas, a classificação destes é feita de acordo com o seu tamanho. ^[53]

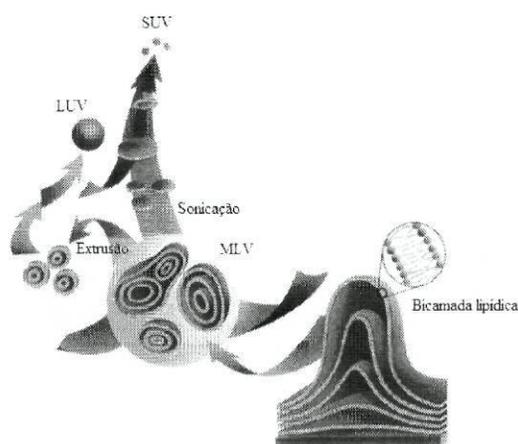


Figura 8 – Representação esquemática dos diferentes tipos de vesículas lipossômicas. (adaptado da página da Internet da Avanti Polar Lipids: www.avantilipids.com)

A simples dispersão dos fosfolípidos em água dá origem a uma suspensão polidispersa de vesículas multilamelares (MLV'S – **M**ulti**L**amellar **V**esicles). As MLV's possuem um tamanho de estrutura relativamente elevado e um volume interno bastante menor devido a subdivisão da estrutura em várias bicamadas concêntricas. ^[55] Embora as MLV's sejam as vesículas mais fáceis de obter, a sua utilização como modelos membranares não é a mais vantajosa e é possível obter vesículas de dimensões controláveis através de métodos alternativos de preparação de lipossomas. As vesículas unilamelares pequenas (SUV's - **S**mall **U**nilamellar **V**esicles) apresentam dimensões entre 20 e 50nm e as vesículas unilamelares grandes (LUV's – **L**arge **U**nilamellar **V**esicles) diâmetros superiores a 50nm.

3.1.2. Propriedades físico-químicas dos fosfolípidos

Os fosfolípidos são os principais constituintes das membranas celulares. Estes, são lípidos que, na sua forma mais simples, são compostos por uma molécula de glicerol, ou esfingosina, esterificada com moléculas de ácido gordo e um grupo fosfato que, por sua vez, se encontra esterificado a um álcool. Deste modo, verifica-se a presença de um carácter anfifílico pois existe um grupo hidrófobo apolar, do qual fazem parte as cadeias hidrocarbonadas (ácidos gordos) e um grupo hidrofílico polar constituído pela molécula de ácido fosfórico e uma molécula hidrossolúvel esterificadas entre si. As suas propriedades físico-químicas vão depender não só das propriedades dos ácidos gordos mas também das características dos grupos hidrossolúveis esterificados. Assim, as moléculas de fosfolípidos poderão ter um carácter neutro ou negativo, de acordo com a carga presente nos grupos esterificados ao ácido fosfórico (Figura 9). ^[53]

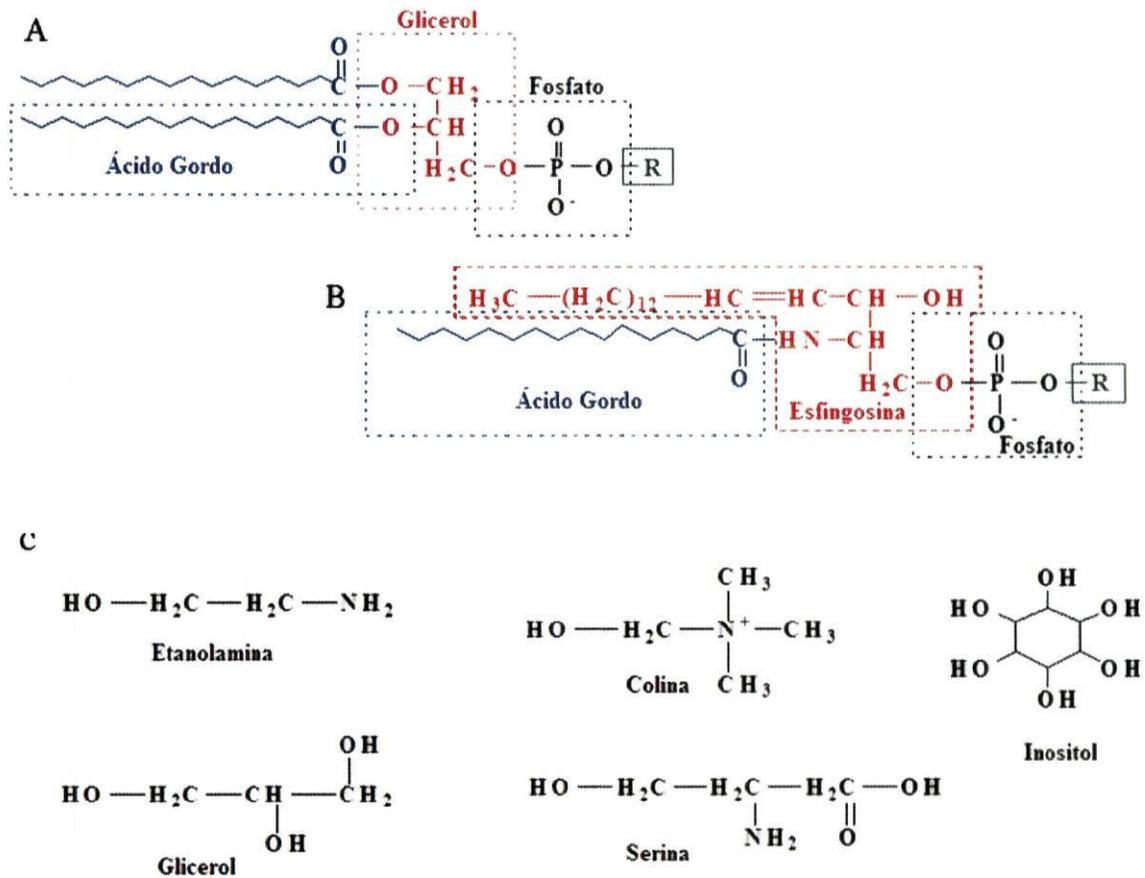


Figura 9 – Representação esquemática de (A) glicerofosfolípido, (B) esfingofosfolípido e (C) grupos que podem esterificar o grupo fosfato.

Os lípidos presentes nas membranas celulares dividem-se em quatro grupos principais: fosfolípidos, esfingolípidos, glicolípidos e esteróis.^[55] Os fosfolípidos derivam de moléculas de glicerol enquanto que os esfingolípidos possuem uma molécula de esfingosina. Os ácidos gordos esterificados podem ser saturados ou insaturados e geralmente possuem cadeias hidrocarbonadas entre C_{10} e C_{28} . No caso dos esfingolípidos, a molécula de esfingosina encontra-se ligada a um ácido gordo através do seu grupo amino (formando uma ligação amida) e o hidroxilo esterificado a uma colina ou etanolamina. Na ausência de uma grupo que esterifique o grupo hidroxilo os esfingolípidos denominam-se ceramidas.

Os fosfolípidos que contêm colina são os mais abundantes na natureza e encontram-se sob a forma de ião dipolar a pH fisiológico devido ao átomo de azoto não evidenciar propriedades ácidas nem básicas a este pH. A fosfatidilcolina (lecitina) e a fosfatidiletanolamina são os únicos fosfolípidos que se apresentam sob a forma de ião dipolar, os restantes apresentam-se sob a forma de anião.

Quanto à sua origem, os fosfolípidos podem ser de origem natural ou sintética. Os de origem natural são extraídos de material biológico como a fosfatidilcolina (lecitina) da gema de ovo ou da soja. Como constituem uma grande parte membrana da celular geralmente são utilizados como principal componente lipídica em lipossomas mas, a sua heterogeneidade é elevada no que diz respeito ao comprimento, composição e saturação das suas cadeias hidrocarbonadas. Os lípidos de origem sintética apresentam uma composição lipídica definida embora as cadeias hidrocarbonadas possam ter maior ou menor número de átomos de carbono, ácidos gordos diferentes ou iguais e cadeias saturadas ou insaturadas. O facto de possuírem uma maior homogeneidade permite uma melhor compreensão, caracterização e manipulação do seu comportamento relativamente aos fosfolípidos de origem natural. [50, 53]

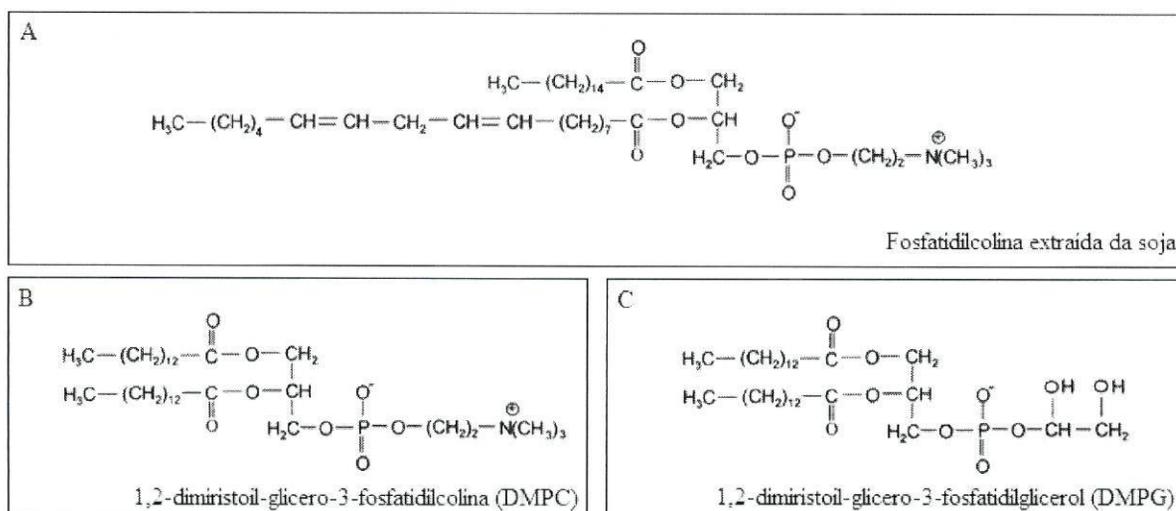


Figura 10 – Fórmulas estruturais de fosfolípidos (A) naturais e (B) e (C) sintéticos.

Propriedades físicas como permeabilidade, temperatura de transição de fase (T_m) ou estabilidade dependem da composição dos ácidos gordos que constituem os fosfolípidos, tanto ao nível do comprimento das cadeias hidrocarbonadas, do seu grau de saturação/insaturação, assim como das propriedades dos grupos polares. [53, 55]

A diferentes temperaturas, as bicamadas fosfolipídicas podem existir em diferentes fases termodinâmicas: uma fase rigorosamente ordenada, chamada de estado de gel ou, numa fase mais fluida. A temperatura de transição de fase (T_m) difere entre os fosfolípidos pois depende da composição das cadeias hidrocarbonadas que cada um possui. O aumento do comprimento e saturação dos ácidos gordos aumenta o valor de T_m .

Para temperaturas inferiores a T_m dos fosfolípidos, a bicamada apresenta uma estrutura ordenada, onde os fosfolípidos se encontram empacotados e com movimentos restritos. No entanto, acima de T_m existe uma maior fluidez da membrana e as moléculas de fosfolípido possuem uma maior liberdade de movimentos.

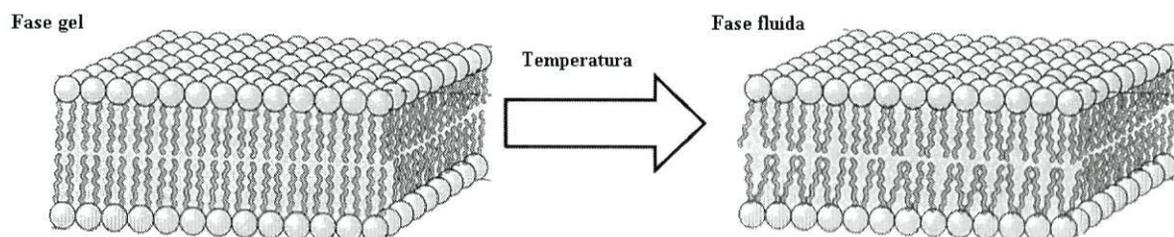


Figura 11 – Representação esquemática da transição de fase em bicamadas lipídicas (adaptado de http://cellbio.utmb.edu/cellbio/membrane_intro.htm).

3.1.3. Preparação de Lipossomas

Os processos de preparação de lipossomas descritos na literatura são vários. Estes podem ser preparados por congelamento/descongelamento, sonicação, extrusão mas a escolha do método a utilizar depende do objectivo final da aplicação dos lipossomas. Todos os métodos de preparação de lipossomas envolvem alguns passos básicos, sendo fundamental, para a obtenção de MLV's, LUV's ou SUV's a dispersão do fosfolípido num meio aquoso. Como as moléculas fosfolipídicas não são solúveis em água, um dos passos da preparação de lipossomas passa pela solubilização dos fosfolípidos num solvente adequado (solvente apolar) após a qual se prepara um filme lipídico por evaporação desse solvente. ^[50, 53]

Das várias abordagens à preparação de lipossomas a primeira surgiu em 1965, por Bangham ^[89], e é conhecida por método de hidratação do filme lipídico. A simples dispersão do filme lipídico em solução aquosa, como já foi referido, produz MLV's, de diferentes tamanhos e número de camadas lipídicas que podem ser, posteriormente, tratadas de forma a obter populações mais homogêneas e de tamanho definido. ^[50, 53]

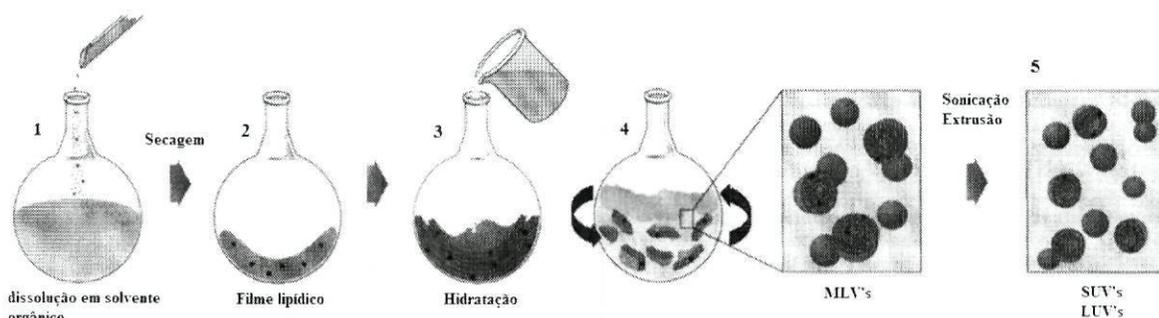


Figura 12 – Representação esquemática da preparação de MLV's pelo método de hidratação do filme lipídico. 1) Dissolução dos lípidos num solvente orgânico adequado; 2) Formação do filme lipídico nas paredes do balão, por evaporação do solvente orgânico; 3) Hidratação do filme por adição de solução aquosa; 4) Agitação e obtenção de MLV's; 5) SUV's ou LUV's obtidas por sonicação ou extrusão (adaptado da página da Internet da Avanti Polar Lipids: www.avantilipids.com).

Destes tratamentos, o mais utilizado para a obtenção de populações mais homogêneas e de tamanho definido são os meios mecânicos, mais especificamente, a extrusão através de filtros de tamanho de poro fixo ou a sonicação.^[50, 53] Ciclos de congelação/dcongelação também podem ser utilizados na obtenção de populações de lipossomas homogêneas uma vez que permitem aumentar o volume interno aquoso dos lipossomas por eliminação das sucessivas camadas de lípido presentes nas MLV's

A sonicação é frequentemente utilizada na preparação de SUV's e pode ser realizada por inserção da suspensão lipossómica num banho ou por inserção de uma ponta de ultra-sons directamente na suspensão.^[50, 55] A extrusão consiste na passagem forçada, através de filtros com um diâmetro de poro bem definido, sob pressão (< 100 atm), atmosfera inerte e a uma temperatura superior à temperatura de transição de fase dos lípidos presentes na suspensão lipossómica. Extrusões sucessivas levam a uma diminuição do número de lamelas que compõem as MLV's e, ao fim de aproximadamente dez passagens, obtém-se uma suspensão lipossómica predominantemente unilamelar e homogênea, no que diz respeito ao diâmetro das vesículas.^[50] As LUV's, de tamanho compreendido entre 50-150nm, permitem uma boa encapsulação e uma boa estabilidade dos lipossomas.

3.2. Sistemas lipossómicos

Presentemente, as aplicações de lipossomas são inúmeras. No entanto, a escolha do sistema a utilizar vai depender do objectivo final da sua aplicação. Hoje em dia, os lipossomas são bastante úteis, como modelos, em diversas disciplinas científicas como a

biofísica (propriedades de membranas celulares e proteínas membranares), química (catálise, fotossíntese), bioquímica (função de proteínas membranares) e biologia (função celular) entre outras.

No entanto, além da sua utilização como modelo membranar, os lipossomas têm sido frequentemente utilizados como vectores farmacológicos no transporte e libertação de fármacos. A sua aplicação implica a encapsulação do fármaco em questão dentro do compartimento aquoso da vesícula dependendo, deste modo, das características físico-químicas do sistema tais como tamanho, eficácia de encapsulação e estabilidade do lipossoma assim como das suas interacções biológicas com as células, ou seja, da sua biocompatibilidade. [56]

As aplicações a nível de mimetização de membranas celulares prendem-se com o facto de tanto os lipossomas como as membranas serem constituídos, na sua maior parte, por fosfolípidos. No entanto, a complexidade de uma membrana biológica é bastante elevada e, embora os lipossomas não mimetizem a membrana perfeitamente, é possível aumentar o nível de similaridade entre os dois sistemas (natural e modelo) por inserção de proteínas (que também fazem parte desses sistemas) nas vesículas lipossómicas. [52]

O estudo de lipossomas permite, também, avaliar o comportamento de fármacos nas células. Dependendo da natureza do fármaco, este pode encontrar-se em diferentes locais membranares quando em contacto com o lipossoma. Assim, em termos de localização, um fármaco pode actuar com as vesículas lipossómicas a três níveis distintos: Se o fármaco for **hidrossolúvel** vai encontrar-se no compartimento aquoso do lipossoma enquanto que se for **hidrofóbico**, encontrar-se-á na zona apolar das membranas, isto é, na zona lipídica da bicamada. Porém, se for **anfotérico**, o fármaco rearranja-se de modo a colocar a sua parte hidrofílica junto aos grupos polares da membrana e a sua parte hidrofóbica junto às cadeias hidrocarbonadas.

3.2.1. Reconstituição de proteínas membranares: Proteolipossomas

As proteínas membranares desempenham papéis essenciais em vários processos celulares como produção de energia, transporte ou permeação membranar de solutos. No entanto, devido à sua elevada complexidade e heterogeneidade é difícil analisar algumas das suas propriedades como relação estrutura-actividade, a sua actividade ou função, entre outras *in situ*. Assim, a extracção e purificação da proteína desejada da membrana nativa e sua inserção numa membrana artificial é fundamental para o estudo

da estrutura e função destas moléculas. ^[57, 58] Porém, a maior parte das proteínas membranares só expressa a sua actividade quando inserida (reconstituída) e orientada correctamente numa bicamada lipídica pelo que se torna necessário a escolha de uma metodologia de reconstituição adequada. ^[57]

Quando as proteínas membranares se encontram reconstituídas em lipossomas, estes passam a designar-se proteolipossomas e são um modelo importante na avaliação da sua estrutura e função. ^[57, 58] Todavia, para que seja possível a utilização de proteolipossomas como modelos miméticos de membranas biológicas é necessário que sejam obedecidas certas condições: para além da preservação da actividade proteica é importante que exista homogeneidade na inserção da proteína, isto é, uma distribuição homogénea de proteína pelos lipossomas; uma orientação final, unidireccional, da proteína (factor que influenciará qualquer estudo de fenómenos de transporte e permeabilidade através de porinas) assim como a morfologia e tamanho dos proteolipossomas, factores estes que dependem do processo de reconstituição. ^[57]

3.2.1.2. Proteolipossomas: Metodologias de reconstituição

Da vasta literatura existente sobre reconstituição de proteínas membranares ^[57-59] é possível identificar quatro estratégias base para o processo de reconstituição: Reconstituição por meios mecânicos, por congelação/descongelação, reconstituição com recurso a solventes orgânicos e reconstituição mediada por detergentes. ^[57] No entanto, uma vez que estas reconstituições já se encontram documentadas ^[45] só se procederá à descrição das técnicas de reconstituição mediadas por detergente, pois foram estas as utilizadas.

Reconstituições mediadas por detergente

Uma vez que maior parte das proteínas é extraída e purificada recorrendo a detergentes os processos de reconstituição que envolvem o uso de detergentes são, geralmente, bem sucedidos. ^[57, 58]

Todas as reconstituições descritas na literatura baseiam-se na co-micelização da proteína num excesso de fosfolípido e na presença de uma quantidade adequada de detergente, de modo a este se encontrar abaixo da sua CMC. Posteriormente, o detergente é removido levando à formação progressiva de lipossomas nos quais se incorporam as proteínas. ^[57] Este tipo de processo possui duas abordagens bastante comuns. A primeira baseia-se na diluição de uma mistura proteína/detergente na

presença de uma suspensão lipossómica. A micela formada (por interacção do detergente com o lipossoma) é destabilizada e a proteína insere-se, facilmente, no lipossoma. A outra abordagem consiste na introdução de detergente na suspensão lipossómica de modo a existir uma saturação dos lipossomas. A presença do detergente vai perturbar as interacções lípido-lípido o que, conseqüentemente, leva a uma maior permeabilidade da membrana. Como existe um aumento da permeabilidade da membrana, a proteína é facilmente incorporada nos lipossomas. ^[57, 58] A principal diferença entre as diferentes abordagens é o processo de remoção de detergente, sendo os processos mais comuns a diálise, diluição, cromatografia de exclusão e adsorção hidrofóbica (Bio-Beads[®]). ^[59]

É importante referir que a inserção de uma proteína em lipossomas saturados com detergente assegura uma inserção unidireccional da proteína na membrana, produzindo, de um modo geral, proteolipossomas mais eficientes. ^[58] A maior desvantagem desta técnica será a produção de proteolipossomas de tamanhos variados ou a presença de detergente, mesmo em concentrações vestigiais, mas que se podem atenuar com a extrusão, que uniformiza o tamanho das vesículas ou a adição de material adsorvente para remoção de detergente. ^[45]

A determinação do processo de remoção de detergente adequado depende das características físico-químicas deste, sobretudo da sua CMC, tamanho micelar e do seu equilíbrio hidro-lipofílico. ^[59] A literatura consultada refere ainda que a velocidade de remoção do detergente pode influenciar propriedades tão importantes como a homogeneidade da distribuição proteica assim como a morfologia dos proteolipossomas. ^[57]

Como já foi referido, serão apenas abordados os processos de remoção de detergente e dentro destes os métodos de remoção por adsorção hidrofóbica e por cromatografia de exclusão.

A **cromatografia de exclusão**, ou filtração por gel, explora a diferença de tamanhos presentes na mistura detergente-proteína-lípido. Os proteolipossomas formam-se ao longo da coluna e, dependendo do seu tamanho, saem em fracções distintas. A maior vantagem desta técnica é o facto de ser uma técnica simples, eficaz na remoção de detergente e rápida. As suas desvantagens consistem na diluição de material encapsulado e não encapsulado, possível retenção das vesículas pelo gel e sobretudo o facto do factor de diluição ser desconhecido. ^[58, 59]

Devido às propriedades anfifílicas dos detergentes, estes facilmente se ligam a resinas hidrofóbicas. A **adsorção hidrofóbica** consiste na adição de esferas adsorventes de poliestireno (Bio-Beads[®]) à mistura micelar de modo a que estas possam remover o detergente presente.^[58] O processo físico de remoção de detergente destas duas técnicas é muito semelhante, porém a adsorção hidrofóbica apresenta algumas vantagens relativamente à cromatografia de exclusão: A ausência de diluição dos materiais envolvidos e a remoção total do detergente, o que permite uma reconstituição das vesículas, mesmo quando utilizados detergentes com uma CMC muito baixa.^[59]

Capítulo II: Metodología Experimental

Capítulo II: Metodologia Experimental

Este capítulo terá como objectivo a descrição, de um modo geral, de todos os modelos matemáticos utilizados na análise dos resultados assim como as condições e execuções experimentais, instrumentação e reagentes utilizados.

1. Reagentes e soluções

A Enrofloxacina (ENR) foi adquirida à Sigma, armazenada no frigorífico, protegida da luz e utilizada sem purificação adicional.

Os lípidos, 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DMPC), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilglicerol (DMPG), 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DPhPC) foram adquiridos à Avanti Polar Lipids, armazenados a -18°C e utilizados sem qualquer purificação adicional.

As sondas de fluorescência 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) e o 1-(4-(trimetilamino)fenil)-6-fenil-1,3,5-hexatrieno (TMA-DPH) foram adquiridas à Sigma, dissolvidas em clorofórmio e metanol, respectivamente, armazenadas a 0°C e ao abrigo da luz.

A solução tampão utilizada em todos os ensaios (Tampão Hepes) foi preparada a partir da pesagem rigorosa do ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N-etanossulfónico, adquirido à Sigma, na concentração 10mM, pH 7,4 e força iónica ajustada a 0,1M com NaCl.

As soluções padrão de dihidrogenofosfato de potássio de qualidade *pro analysi*, utilizadas no doseamento dos lípidos, foram adquiridas à Merck e preparadas por diluição de uma solução mais concentrada (preparada após pesagem rigorosa). O reagente de Fiske & Subbarow (Sigma) e o Molibdato de Amónio (Fluka), igualmente usados no doseamento dos lípidos, foram preparados no momento da sua utilização.

A solução de iodeto de potássio (Merck *pro analysi*), preparou-se por pesagem rigorosa e dissolução em tampão Hepes no dia da sua utilização. À solução adicionou-se tiosulfato de potássio (10mM) para prevenir a formação de I_3^- . A solução de iodeto de potássio, em cada preparação, foi doseada por titulação com uma solução padrão de iodato de potássio (Merck *pro analysi*), numa mistura de tetracloreto de carbono e ácido clorídrico concentrado.

As soluções de fármaco utilizadas foram, preparadas em tampão Hepes (10mM, pH 7,4, 0,1M NaCl), na sua maioria, por diluição de soluções mais concentradas, armazenadas a 4°C e ao abrigo da luz.

As suspensões lipossômicas foram preparadas em tampão Hepes, mantidas a 4°C e sempre ao abrigo da luz.

Na reconstituição membranar da proteína OmpF utilizou-se o detergente n-octil-polioxiétileno (oPOE) da Bachem AG e qualidade *pro analysi*.

As soluções padrão de BSA (albumina bovina) utilizadas no doseamento da proteína foram preparadas por diluição em tampão hepes de uma solução mais concentrada (1mg/mL) adquirida à Sigma. As soluções de ácido bicinonínico e sulfato de cobre utilizadas no mesmo doseamento foram adquiridas à sigma e fazem parte de um kit designado BCA-1, para doseamento de proteínas.

2. Instrumentação

O espectrofotómetro utilizado, para determinações de ultravioleta-visível, foi um espectrofotómetro UNICAM UV-300 equipado com acessório de controlo de temperatura por circulação de água termostaticada a $37,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

As determinações de fluorescência foram realizadas num espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse, ligado a um dispositivo de controlo de temperatura rigoroso ("peltier single cell holder" da Varian) de modo a permitir estudos realizados a diferentes temperaturas.

As suspensões lipossômicas multilamelares (MLV's) foram extrudidas (para originar as unilamelares) num extrusor Lipex Biomembranes de capacidade 10mL e filtros de policarbonato da Nucleopore-Corning.

Os estudos de tamanho dos lipossomas e proteolipossomas foram realizados num Zeta Sizer Nano ZS da Malvern Instruments.

Todas as pesagens foram efectuadas numa balança analítica Mettler AT201 ($\pm 2 \times 10^{-5}\text{g}$).

Para as determinações de condutividade eléctrica, utilizou-se um par de eléctrodos Ag/AgCl da World Precision Instruments (Sarasota, FL), ligados a um amplificador Dagan PC-ONE (Minneapolis, MN, USA).

3. Preparação de lipossomas

Para a preparação de lipossomas, optou-se pelo processo mais usual de preparação, que se designa por método de hidratação do filme lipídico descrito por Bangham.^[89]

Dissolveu-se o lípido (DMPC e DMPG) em clorofórmio e clorofórmio:metanol (1:1), respectivamente, e evaporou-se o solvente orgânico até à secura sob uma corrente de Árgon, num balão de fundo redondo. Após a evaporação do solvente orgânico, o filme permaneceu sob uma corrente de vácuo no mínimo 3h para eliminar qualquer vestígio de solvente orgânico.

Após 3h, hidratou-se o filme preparado com solução tampão Hepes (10mM; pH 7,4; 0,1M NaCl) e agitou-se a suspensão em vórtice alternando com imersão num banho de temperatura superior à de transição de fase formando, deste modo, vesículas multilamelares (MLV's).

Realizaram-se, então, 5 ciclos de congelação/descongelação (Azoto líquido a -196°C / banho termostático a 37°C) e deixou-se a suspensão final estabilizar, durante 30min, num banho termostático a 37°C . Após o período de estabilização fez-se passar a suspensão lipídica de MLV's pelo extrusor. A extrusão foi realizada a 37°C , a uma pressão de 250 bar em atmosfera inerte (corrente de árgon) fazendo passar a suspensão lipossómica por filtros de polycarbonato de diâmetro de 100nm.

No final a suspensão lipídica apresenta um aspecto translúcido e é constituída por lipossomas unilamelares com $\sim 100\text{nm}$ de diâmetro.

4. Preparação de proteolipossomas

A preparação de proteolipossomas foi feita por inserção da proteína membrana OmpF em lipossomas pré-preparados. Esta técnica consiste na encapsulação da proteína nos lipossomas, uma vez que o detergente presente na proteína transforma os lipossomas em micelas e por passagem na coluna de gel, os lipossomas são formados de novo inserindo em si a proteína.

O objectivo desta reconstituição, em alternativa à reconstituição de OmpF por adsorção hidrofóbica do detergente, teve como base o facto de ser uma técnica mais rápida e fácil de executar.

4.1. Reconstituição da proteína membrana OmpF em lipossomas preparados por Cromatografia de Exclusão

A reconstituição foi efectuada por mistura de 1,0mL de suspensão lipídica, após obtenção das LUV's, preparada de acordo com o procedimento já referido, com 1,0mL de OmpF (0,191mg/mL, ~0,5% oPOE) durante 40min à temperatura ambiente (razão lípido/proteína final 1000:1 mol/mol).

A suspensão resultante foi colocada na coluna de gel Sephadex G-50, foram recolhidas alíquotas de 1mL e o seu comportamento observado por espectroscopia de UV-Vis e Fluorescência. Este processo foi acompanhado pela preparação de amostras de referência, preparadas por adição de 10 μ L de oPOE (Octyl-POE) a 2,0mL de suspensão lipossómica e misturados, suavemente, durante 40min à temperatura ambiente. A extracção de oPOE, em ambas as situações, prevê-se que tenha sido alcançada pela passagem dos lipossomas por uma coluna de gel Sephadex G-50 formando, de novo, as vesículas. Recolheram-se alíquotas de 1mL e todo o seu comportamento observado por espectroscopia de UV-Vis.

5. Doseamento de lípidos

Para o doseamento dos lípidos, recorreu-se a um método de determinação da quantidade de fosfato em cada amostra, designado por método de Bartlett modificado, que permite, indirectamente, determinar a concentração de fosfolípido nas mesmas.

Este doseamento consistiu na adição de 0,4mL de ácido perclórico 70% a 0,5mL de cada amostra e solução padrão de fosfato de potássio e posterior incubação em banho de areia, a uma temperatura controlada entre 180 e 200°C durante 1h.

Após o arrefecimento à temperatura ambiente das amostras, adicionou-se 4,6mL de molibdato de amónio e 0,2mL de reagente de Fiske & Subbarrow e deixou-se a incubar num banho de água a 100°C durante 7min. Após arrefecimento à temperatura ambiente procedeu-se à leitura da absorvância das amostras a 830nm.

6. Doseamento de proteína

Para a determinação da concentração de OmpF recorreu-se ao método do ácido bicinconínico.

O kit de doseamento é constituído por 2 reagentes designados por A e B e por uma solução de BSA (1,0mg/mL em solução aquosa, 0,15M NaCl e 0,05% azida sódica). O reagente A é uma solução de ácido bicinconínico, carbonato de sódio, hidrogenocarbonato de sódio e tartarato de sódio em hidróxido de sódio 0,1N (pH 11,25) enquanto que o reagente B é uma solução a 4% de sulfato de cobre (II) pentahidratado.

O reagente de trabalho preparou-se por mistura de 50 partes de reagente A para 3 partes do reagente B.

A cada tubo contendo 0,1mL de amostra, padrões de BSA (preparados por diluição da solução mãe de BSA) ou solução tampão Hepes (branco) adicionaram-se 2mL de reagente de trabalho e deixou-se a incubar durante 30min a 37°C. Após arrefecimento dos tubos à temperatura ambiente mediu-se a absorvância de cada tubo a 562nm. A concentração de proteína foi determinada com base na recta de calibração traçada de acordo com os valores de absorvância obtidos para as soluções padrão de BSA (100-600µg/mL).

7. Determinação de coeficientes de partição por espectrofluorimetria

Prepararam-se dois conjuntos de 8 a 10 microtubos de 2,0mL destinados às amostras e respectivas referências. Aos dois conjuntos adicionaram-se volumes crescentes de suspensão lipídica unilamelar (iguais volumes para amostras e referências) e, somente às amostras, adicionou-se um volume constante de solução de Enrofloxacin. Preparou-se, ainda, um outro microtubo no qual se adicionou, unicamente, o mesmo volume de solução de Enrofloxacin adicionado às amostras. Perfez-se o volume de todos os microtubos até 1,5mL com tampão Hepes.

Agitou-se em vórtice cada microtubo, sempre protegidos da luz, durante 1min e, durante 30min procedeu-se à incubação dos mesmos num banho a 37°C.

A análise de todos os microtubos foi feita a 37°C, velocidade de varrimento de 240nm/min, fendas de excitação/emissão de 5nm.

8. Estudos de localização membranar

8.1. Extinção de fluorescência da Enrofloxacin pelo ião iodeto

A extinção de fluorescência é utilizada como método complementar para a determinação da localização do fármaco na membrana, neste caso, no modelo membranar.

Para a realização destes estudos três conjuntos de oito a dez microtubos de 2,0mL foram preparados, sendo dois dos conjuntos destinados às amostras e o outro às referências. Os conjuntos das amostras foram preparados por adição de uma quantidade constante, a cada conjunto, de suspensão lipossômica de DMPC ou DMPG (500 e 750 μ M), seguida por adição de um volume constante, em todos os microtubos, de solução de enrofloxacin (7,4 μ M) e quantidades crescentes de solução de KI (0,007 a 0,220 M). As referências foram preparadas do mesmo modo mas, sem adição de suspensão lipossômica. Posteriormente, amostras e referências foram agitadas em vórtice durante 1min, e depois foram incubadas a 37 °C, durante 1h. Os espectros de emissão de fluorescência foram realizados à temperatura de 37 °C, com velocidade de varrimento de 240nm/min, fendas de excitação/emissão de 5,0nm e ao comprimento de onda de excitação de 272nm, no intervalo de comprimentos de onda de emissão de 282 e 530nm.

8.2. Anisotropia de Fluorescência em lipossomas e proteolipossomas

Os estudos anisotrópicos realizados foram adaptados da literatura.^[73, 74]

As sondas fluorescentes utilizadas foram o DPH (1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno) e o TMA-DPH (1-[4-(dimetilamino)fenil]-6-fenilhexatrieno).

Fundamentalmente, para os estudos de incubação (estudos onde os (proteo)lipossomas são colocados em contacto com as sondas), adicionaram-se 1,5 μ L e 2,0 μ L de DPH (3,23mM) e TMA-DPH (2,64mM), respectivamente a 800 μ L de suspensão lipossômica (lipossoma e proteolipossoma) durante 40min a 37°C, de modo a que a razão final lípido/sonda fosse de 300:1 mol/mol.

Para os estudos de incorporação, foram adicionados, respectivamente, 10 μ L e 13 μ L de DPH e TMA-DPH ao lípido dissolvido em clorofórmio antes da secagem do filme lipídico.

Todos os resultados foram obtidos por incrementos de 3°C na gama de temperaturas entre 4 e 40°C.

8.3. Extinção de fluorescência de OmpF pelo ião iodeto na presença e ausência de Enrofloxacina

Após a preparação de proteolipossomas, pela metodologia já descrita, mediu-se um volume adequado de proteolipossomas (fracção mais concentrada) para a célula de fluorescência e uma quantidade constante de ENR, no estudo envolvendo a presença de antibiótico, de modo a obter um volume final de 1,0mL. Após estabilização da mistura a 37°C e sob agitação (cerca de 2min) realizou-se um espectro de fluorescência da mistura na ausência do agente de extinção. Após a aquisição deste espectro adicionou-se sucessivamente volumes constantes de 10 µL iodeto de potássio, intercaladas por períodos de 2min de incubação e agitação, ao fim dos quais se adquiriu os respectivos espectros de fluorescência.

A aquisição dos espectros realizou-se com agitação constante, fendas de excitação/emissão de 5nm, velocidade de varrimento de 240nm/min, comprimento de onda de excitação de 290nm e no intervalo de 300-400nm.

8.4. Determinação de constantes de associação Enrofloxacina/OmpF

Os proteolipossomas foram preparados pela metodologia já descrita. Mediu-se um volume adequado de proteolipossomas (fracção mais concentrada) para a célula de fluorescência de modo a obter um volume final de 1,0mL (perfazendo o volume com tampão Hepes). Após incubação da mistura a 37°C e sob agitação durante 2min, realizou-se um espectro de fluorescência da mistura na ausência de Enrofloxacina. Após a aquisição deste espectro adicionaram-se, sucessivamente, volumes constantes de 20µL de ENR 10µM, intercaladas por períodos de 2min de incubação e agitação, ao fim dos quais de adquiriu os respectivos espectros de fluorescência.

A aquisição dos espectros realizou-se com agitação constante, fendas de excitação/emissão de 5nm, velocidade de varrimento de 240nm/min, comprimento de onda de excitação de 290nm e no intervalo de 300-400nm.

8.5. Estudos de Condutividade Eléctrica de OmpF na presença de Enrofloxacina

Os ensaios de condutividade eléctrica e consistem na análise das flutuações de corrente iónica através da proteína OmpF provocadas pela adição de antibiótico.

A preparação da célula de trabalho consiste na junção das duas metades que a constituem sendo colocada entre elas, uma membrana de Teflon[®] (tetrafluoroetileno) com 25µm de espessura. A membrana de Teflon possui um orifício central de diâmetro compreendido entre 80-100µm realizado por incisão de um laser na membrana. O orifício, uma vez que é o elemento de ligação entre os dois compartimentos da célula, vai ser o local onde os lípidos vão aderir para formar a bicamada lipídica e, por ser necessário aumentar a sua hidrofobicidade, realizou-se um pré-tratamento com uma solução de hexadecano em hexano, nos contornos do orifício central, seguido de um período de espera de 20min para evaporação do solvente orgânico.

De seguida, encheram-se os compartimentos da célula com 250µL de solução tampão MES, adicionou-se 1µL de lípido (DPhPC em pentano) e aguardou-se 10min para evaporação do solvente orgânico, após o qual se colocou a célula no interior de uma gaiola de Faraday. Os compartimentos da célula ligam-se ao circuito externo através de um par de eléctrodos Ag/AgCl.

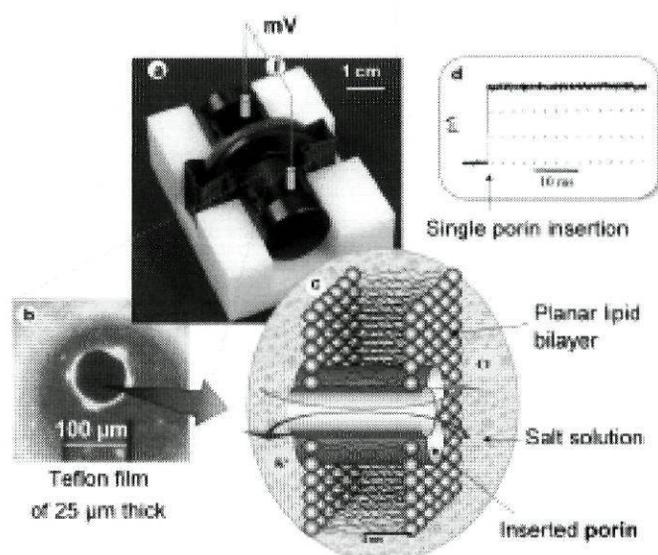


Figura 13 – (a) Célula de Trabalho, (b) fotografia de microscópio electrónico do orifício da membrana de Teflon, (c) ilustração da bicamada lipídica com OmpF inserida, (d) registo do aumento de intensidade de corrente por inserção de OmpF na bicamada. ^[72]

A bicamada lipídica foi formada pela técnica de oposição de monocamadas lipídicas, que resulta de uma lenta e gradual remoção/reposição do tampão dos compartimentos após a formação da monocamada à superfície da fase aquosa.

A inserção de OmpF foi feita por adição de 0,5 μ L de uma solução 1,16mg/mL de OmpF a um dos compartimentos da célula. A incorporação da proteína foi facilitada aplicando “agitação” (remoção/reposição do tampão presente no compartimento) e por aplicação de voltagem entre 100-200mV. A inserção foi observada pelo aumento da intensidade de corrente.

Após inserção “única” renovou-se o tampão presente no compartimento onde foi inserida a proteína para impedir a inserção de mais do que uma porina na bicamada. Seguiu-se um período de espera de +/-1h para certificar que a inserção continuava a ser “única”. Seguiram-se as medições de intensidade de corrente iônica, através da porina OmpF, antes e depois de adições sucessivas de soluções de antibiótico. Estas adições foram feitas ao mesmo lado onde a proteína foi inserida (lado cis), ao lado oposto da inserção (lado trans) e em ambos os compartimentos da célula de trabalho.

Todas as medições foram feitas à temperatura ambiente e num compartimento com controlo de humidade e ruído.

Uma vez que o antibiótico é de difícil dissolução para concentrações elevadas, todas as medições foram feitas com preparações extemporâneas de Enrofloxacin (~12mM). O tampão e o pH do mesmo foram alterados de modo a obter uma melhor dissolução do antibiótico (referências bibliográficas indicam que o antibiótico é mais solúvel para pH próximo de 5,2). O tampão utilizado foi MES (3mM, pH 5,5) com 150mM em KCl. A concentração das várias soluções foi determinada com base em espectros de UV-Vis dessas mesmas soluções. A lei de Beer-Lambert da Enrofloxacin foi realizada no tampão utilizado para todos os ensaios de condutividade iônica para posterior determinação da concentração das soluções de Enrofloxacin adicionadas às células de trabalho com base nos espectros de UV-Vis traçados.

9. Modelos matemáticos experimentais

9.1. Coeficientes de Partição

9.1.1. Determinação de coeficientes de partição por Espectrofluorimetria

A caracterização da emissão de fluorescência é feita por diversos parâmetros, no entanto, os parâmetros mais importantes num fluoróforo são o seu rendimento quântico (Φ_f) e o seu tempo de vida de fluorescência (τ). As definições de rendimento quântico e tempo de vida de fluorescência são, respectivamente, o número de fótons emitido relativamente ao número de fótons absorvidos e tempo médio que a molécula permanece no estado excitado antes de regressar ao estado fundamental. ^[61]

Efeito de filtro interno

É de elevada importância referir que as intensidades de fluorescência são directamente proporcionais à concentração do fluoróforo apenas numa gama de densidades ópticas (absorvâncias) limitada. A este fenómeno chama-se efeito de filtro interno. Este efeito pode levar a um decréscimo da intensidade de fluorescência observada por absorção da fluorescência. A importância relativa de cada processo depende da densidade óptica das amostras ao comprimento de onda de excitação e emissão. ^[61]

A intensidade de fluorescência não é proporcional à concentração de fluoróforo devido ao efeito de filtro interno. Este efeito é provocado pela absorção de alguma da luz incidente antes da mesma chegar ao ponto onde a luminescência é observada (efeito de filtro interno) e reabsorção de alguma da luz emitida antes desta sair da célula (efeito de filtro interno secundário). Devido ao efeito de filtro interno, a intensidade de fluorescência observada vai depender da densidade óptica do fluoróforo ao comprimento de onda de excitação e emissão. ^[62]

Em soluções consideravelmente diluídas (absorvâncias muito pequenas) estabelece-se uma relação onde é evidente a proporcionalidade entre a intensidade de fluorescência e a concentração de fluoróforo. Quando a concentração de uma solução é baixa o suficiente ($Abs < 0,1$) a luz incidente é ligeiramente atenuada ao longo da cuvette enquanto que quando a concentração é elevada uma parte significativa da luz incidente é absorvida antes de chegar ao ponto central da cuvette. Consequentemente é importante salientar, novamente, que a intensidade de fluorescência de um composto é proporcional

à concentração apenas numa gama restrita de densidades ópticas. Para aplicações analíticas, quando é desejada uma relação linear entre a intensidade de fluorescência e a concentração, é necessário construir uma curva de correcção nas condições em que todos os futuros ensaios serão realizados. [60]

Assim, partindo da densidade óptica de soluções de Enrofloxacin de diferentes concentrações e da intensidade de fluorescência observada para as mesmas, é possível a construção de um gráfico que evidencie o comportamento das diferentes soluções, de modo a poder determinar se, para absorvâncias superiores a 0,1, existe influência do efeito de filtro interno ou não.

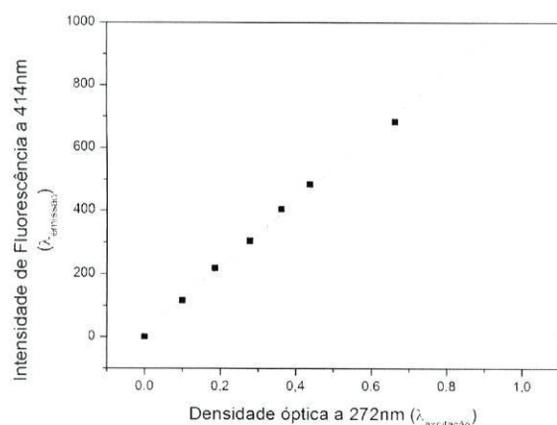


Figura 14 – Gráfico para determinação da influência do efeito de filtro interno nos ensaios efectuados com soluções de Enrofloxacin de Abs>0,1.

O sucesso da utilização da espectrofluorimetria, no estudo da estrutura e dinâmica da matéria ou sistemas vivos deve-se à elevada sensibilidade das técnicas fluorométricas, a especificidade das características da fluorescência dado ao microambiente da molécula emissora e, da capacidade da última fornecer informação temporal e espacial. [60]

A partição de moléculas para bicamadas lipídicas e membranas biológicas é a base para o transporte passivo de fármaco e metabolitos através de membranas e pode estar envolvido no mecanismo molecular da sua acção terapêutica. [63]

9.1.2. Modelos Matemáticos para a determinação de coeficientes de partição

O coeficiente de partição entre um fármaco em solução aquosa e as bicamadas lipídicas presentes nos lipossomas é dado por:

$$Kp = \frac{(C_L / C_T) / [L]}{(C_{Aq} / C_T) / [Aq]} \quad (1.0)$$

onde, C_T , C_L e C_{Aq} são, respectivamente, a concentração molar de fármaco total, na fase lipídica e na fase aquosa e $[L]$ e $[Aq]$ as concentrações molares de lípido e água.

Na maior parte dos casos, o coeficiente de partição entre uma fase lipídica e uma aquosa pode ser determinado desde que existam diferenças na fluorescência da molécula que se vai particionar em solução aquosa e quando particionado na membrana ou quando a molécula não possui fluorescência, alterações nas propriedades fluoróforas de uma sonda de fluorescência. Assim, é possível reescrever a equação (1.0) de modo a incluir estas alterações. Para a espectrofluorimetria é possível determinar o coeficiente de partição, através do método de regressão não linear, a partir da equação seguinte: ^[75]

$$\Delta I = \frac{K_p \Delta I_{\text{máx}} [L]}{[Aq] + K_p [L]} \quad (1.2)$$

Os valores de K_p são obtidos por ajuste da equação (1.2) aos resultados experimentais obtidos (ΔI vs $[L]$) para uma determinada concentração de fármaco.

9.2. Estudos de localização membranar

9.2.1. Extinção de fluorescência

A extinção de fluorescência é uma técnica que não só permite estudar e compreender os fenómenos que lhe estão associados como é uma fonte importante de informação sobre sistemas químicos e bioquímicos.

Existem dois tipos de extinção de fluorescência: dinâmica (colisional) ou estática, em que qualquer um deles implica, obrigatoriamente, a existência de contacto entre o fluoróforo e o agente de extinção. A extinção de fluorescência dinâmica consiste na desactivação de fluorescência do estado excitado por colisão do fluoróforo com o agente de extinção durante o tempo de vida do estado excitado. Geralmente, após o contacto entre ambos o fluoróforo regressa ao estado fundamental, sem emissão de um fóton e sem qualquer alteração química das moléculas envolvidas. Na extinção de fluorescência estática, existe a formação de um complexo, não fluorescente, entre o fluoróforo e o agente de extinção. ^[61]

Outro método de distinção entre estes dois tipos de extinção de fluorescência envolve a análise dos espectros de absorção das espécies em contacto. Enquanto que a extinção de fluorescência dinâmica afecta apenas os estados excitados dos fluoróforos, não se verificam quaisquer alterações aos seus espectros de absorção enquanto que na extinção de fluorescência estática a formação e presença do complexo não fluorescente mesmo no estado fundamental vai influenciar as propriedades espectroscópicas do sistema.^[61]

9.2.1.1. Extinção de fluorescência dinâmica

A extinção de fluorescência dinâmica, ou colisional, é descrita pela equação de Stern-Volmer:^[61]

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \cdot \tau_0 \cdot [Q] = 1 + K_D \cdot [Q] \quad (2.0)$$

onde F_0 e F representam, respectivamente, a intensidade de fluorescência na ausência e presença do agente de extinção, k_q é a constante bimolecular de velocidade do processo de extinção, τ_0 o tempo vida na ausência e presença do agente de extinção e $[Q]$ a concentração de agente de extinção. A constante de Stern-Volmer é dada por $k_q \tau_0$ e representa-se por K_D ou K_{SV} . A representação gráfica de $\frac{F_0}{F}$ vs $[Q]$, geralmente, origina uma recta de ordenada na origem igual 1 e declive igual a K_D .^[61]

9.2.1.2. Extinção de fluorescência estática

Neste tipo de extinção, existe a formação de um complexo não fluorescente entre o agente de extinção e o fluoróforo. Este fenómeno pode ser traduzido por uma equação, semelhante à equação para a extinção de fluorescência dinâmica, mas onde K_S é constante de formação do complexo não fluorescente.^[61]

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_S \cdot [Q] \quad (2.1)$$

O facto de se tratar de uma extinção de fluorescência estática não influencia a relação entre $\frac{F_0}{F}$ vs $[Q]$ e esta mantém-se linear, tal como para o outro fenómeno de extinção. Deste modo, a distinção entre os dois fenómenos torna-se mais complicada

mas é possível distinguir os dois tipos de extinção de fluorescência por vários métodos. De longe, o método mais eficaz é a determinação dos tempos de semi-vida de cada um dos processos. No entanto, também é possível a sua distinção pela sua diferente dependência da temperatura e viscosidade. A temperaturas elevadas, a viscosidade do meio vai diminuir aumentando a difusão das moléculas e como a extinção de fluorescência dinâmica depende da difusão, o aumento de temperatura vai aumentar a sua constante de extinção. Contudo, a temperaturas mais elevadas a estabilidade dos complexos diminui, levando a uma menor extinção de fluorescência estática. Outro método para a distinção entre os dois fenómenos, já foi referido, e consiste na observação de alterações aos espectros de absorção, que não são observados na extinção de fluorescência dinâmica.^[61]

Desvios à linearidade da equação de Stern-Volmer:

Os fenómenos de extinção abordados, apresentam relações lineares de Stern-Volmer o que indica que ocorre apenas um tipo de extinção de fluorescência, no entanto, podem existir desvios positivos ou negativos a essa linearidade pela simultaneidade dos fenómenos assim como fenómenos alternativos à extinção de fluorescência.^[61]

Desvios positivos:

Os desvios positivos consistem numa curvatura em direcção ao eixo das ordenadas, na representação gráfica da relação de Stern-Volmer. Quando o desvio positivo se deve à simultaneidade dos dois processos de extinção (dinâmico e estático) a equação de Stern-Volmer representa-se do seguinte modo:^[61]

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_D [Q])(1 + K_S [Q]) \quad (2.2)$$

multiplicando os termos entre parêntesis, obtemos a relação:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + (K_D K_S) [Q] + K_D K_S [Q]^2 \quad (2.3)$$

Outro fenómeno que leva a desvios positivos designa-se por teoria da esfera de acção e ocorre quando a extensão da extinção de fluorescência é elevada. Esta teoria considera que a componente estática se deve à proximidade do agente extintor com o

fluoróforo no momento de excitação, assumindo que existe uma esfera de volume V a rodear o fluoróforo. Quando tal acontece a desactivação de fluorescência é imediata e unitária. A equação de Stern-Volmer que descreve este processo é representada por: ^[62]

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_D [Q])e^{V[Q]} \quad (2.4)$$

onde V é o volume da esfera e K_D a constante de Stern-Volmer para o processo de extinção dinâmico.

Desvios negativos:

Quando um sistema possui diferentes populações de fluoróforos em diferentes ambientes, portanto, com diferentes acessibilidades do agente de extinção, como por exemplo os triptofanos de uma proteína, a equação de Stern-Volmer vai sofrer desvios à sua linearidade, em direcção ao eixo das abcissas. Deste modo, a intensidade de fluorescência total (F_0) na ausência de agente de extinção é representada por: ^[61]

$$F_0 = F_{0a} + F_{0b} \quad (2.5)$$

Na presença do agente de extinção, f_a (intensidade de fluorescência da fracção acessível) diminui de acordo com a equação de Stern-Volmer enquanto que a fracção inacessível f_b não sofre qualquer alteração à sua intensidade de fluorescência. Deste modo, a intensidade de fluorescência total é dada por: ^[61]

$$F_0 = \frac{F_{0a}}{1 + K_a [Q]} + F_{0b} \quad (2.6)$$

onde K_a é a constante de Stern-Volmer para a fracção acessível e $[Q]$ a concentração de agente extintor. A subtracção das duas equações anteriores (2.5) e (2.6) origina a seguinte equação:

$$\Delta F = F_0 - F = F_{0a} \left(\frac{K_a [Q]}{1 + K_a [Q]} \right) \quad (2.7)$$

Fazendo o inverso da equação (2.7) e dividindo-a pela equação (2.5) a equação que se obtém é:

$$\frac{F_0}{\Delta F} = \frac{1}{f_a K_a [Q]} + \frac{1}{f_a} \quad (2.8)$$

onde f_a é a fracção inicial acessível ao agente extintor e é definida por:

$$f_a = \frac{F_{0a}}{F_{0a} + F_{0b}} \quad (2.9)$$

A partir destas modificações à equação de Stern-Volmer é possível determinar f_a e K_a a

partir da representação gráfica de $\frac{F_0}{\Delta F}$ vs $\frac{1}{[Q]}$. [61, 64]

Correcções devido a interferências espectrais:

Na eventualidade do agente de extinção absorver ao comprimento de onda de excitação do fluoróforo, é necessário efectuar a correcção da intensidade de fluorescência observada a partir da equação seguinte: [65]

$$F_{ex} = F \cdot \frac{A_T}{A_F} \cdot \frac{1 - 10^{-A_F}}{1 - 10^{-A_T}} \quad (3.0)$$

onde F_{ex} é a intensidade de fluorescência corrigida para a excitação, F a intensidade de fluorescência obtida experimentalmente, A_T e A_F , respectivamente, a absorvância de uma solução contendo o fluoróforo e o agente extintor nas concentrações utilizadas e a absorvância do fluoróforo na ausência de agente extintor ao comprimento de onda de excitação do fluoróforo.

Se, porventura, o agente de extinção absorver ao comprimento de onda de emissão, a seguinte correcção terá de ser realizada:

$$F_{em} = F_{exc} \cdot \frac{2,303 \cdot A_0}{1 - 10^{-A_0}} \quad (3.1)$$

onde F_{em} corresponde à intensidade de fluorescência corrigida para a emissão, A_0 a absorvância de uma solução do agente de extinção ao comprimento de onda de emissão do fluoróforo, nas concentrações utilizadas.

9.2.1.3. Agentes de extinção de fluorescência

São vários os iões e moléculas com capacidade para actuar como agentes de extinção de fluorescência, entre os quais se encontram o oxigénio molecular (que extingue a fluorescência de praticamente todos os fluoróforos conhecidos), a acrilamida, o ião iodeto ou brometo. ^[61]

Uma vez que existe uma extensa variedade de substâncias que podem actuar como agentes extintores de fluorescência, é comum a indicação de combinações agentes de extinção-fluoróforo, pois nem todos os fluoróforos sofrem extinção pelos agentes existentes. É importante referir que a extinção de fluorescência depende do processo de extinção envolvido que, por sua vez, depende das propriedades químicas das moléculas (fluoróforo e agente de extinção). ^[61]

No caso da extinção de fluorescência em estruturas organizadas, como em membranas ou proteínas, convém mencionar que a extinção vai depender da acessibilidade dos agentes extintores ao fluoróforo. ^[61]

9.2.2. Extinção de fluorescência de proteínas

As proteínas possuem resíduos de triptofano, responsáveis pela sua fluorescência intrínseca. Esta fluorescência é geralmente utilizada como ferramenta em estudos estruturais de proteínas. Estudos de extinção de fluorescência são frequentemente utilizados uma vez que permitem determinar as diferentes acessibilidades dos triptofanos ao agente de extinção. Esta técnica é frequentemente utilizada em proteínas em solução mas, no entanto, quando estas se encontram inseridas em membranas existe uma maior dificuldade de acessibilidade devido à polaridade da maior parte dos agentes de extinção. ^[66]

A extinção de fluorescência é utilizada para distinguir as diferentes localizações dos resíduos de triptofano com base nas diferenças químicas e estruturais dos diferentes agentes de extinção existentes, como o ião iodeto, a acrilamida, ou oxigénio. ^[67]

Relativamente a este trabalho, a localização da enrofloxacin em membranas assim como o seu local de interacção com a proteína OmpF, o agente extintor da fluorescência da fluoroquinolona e triptofanos utilizado, foi o ião iodeto. O ião iodeto, assim como a acrilamida (não utilizada neste estudo) são agentes de extinção hidrossolúveis no entanto, apresentam diferenças a nível de tamanho e carga assim como a nível de extinção de fluorescência membranar. Contudo, estudos realizados

mostram que, embora o ião iodeto seja hidrossolúvel, ele possui a capacidade de penetrar membranas e proceder à extinção de fluorescência de fluoróforos presentes em ambientes membranares.^[66]

Se a proteína possuir, unicamente, um fluoróforo, a extinção de fluorescência pode ser determinada directamente através da equação de Stern-Volmer (2.0). No caso de OmpF, cada monómero possui dois triptofanos, em posições distintas pelo que é necessário adaptar a equação (2.0) ao facto de existirem acessibilidades diferentes. Assim, a determinação da extinção de fluorescência é determinada a partir das equações (2.5)-(2.9).

9.2.3. Anisotropia de Fluorescência

A anisotropia de fluorescência permite obter informações sobre vários ambientes membranares desde a sua fluidez a informações sobre tamanho, forma e localização de proteínas sendo, por este motivo utilizada frequentemente nas aplicações bioquímicas da fluorescência.^[61]

O princípio de “acção” da anisotropia de fluorescência consiste na excitação dos fluoróforos por luz polarizada e determinado pelo grau de polarização da luz emitida. Deste modo, os fluoróforos absorvem, preferencialmente, fotões cujos vectores eléctricos se encontrem alinhados paralelamente ao momento de transição do fluoróforo orientado de acordo com os eixos moleculares. Numa solução isotrópica os fluoróforos encontram-se orientados aleatoriamente mas, quando excitados com luz polarizada, as moléculas cujo vector de absorção se encontra paralelo ao vector eléctrico de excitação são preferencialmente excitadas (excitação selectiva). Esta excitação selectiva origina uma população de fluoróforos parcialmente orientados e uma emissão de fluorescência, também, parcialmente polarizada. A despolarização da emissão pode dever-se a diversos factores, sendo o factor mais comum a difusão rotacional das moléculas de fluoróforo. O deslocamento angular de um fluoróforo entre a absorção e consequente emissão de um fotão depende da extensão da difusão rotacional durante o tempo médio de vida do estado excitado e é representado pelos valores de anisotropia (r).^[61]

A medição da intensidade da emissão, após a excitação com luz verticalmente polarizada, é feita por um polarizador. Quando este se encontra orientado paralelamente à polarização da excitação a intensidade observada designa-se por I_{VV} e, por analogia,

quando se encontra perpendicular à excitação a sua designação é I_{VH} . Estes valores são utilizados para calcular a anisotropia de fluorescência que é dada pela equação: ^[61]

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad (3.2)$$

onde I_{VV} corresponde à intensidade de uma excitação e emissão verticalmente polarizada, I_{VH} corresponde à intensidade de uma excitação verticalmente polarizada e uma emissão horizontalmente polarizada. G denomina-se factor G e corresponde à sensibilidade do sistema para a detecção de luz polarizada e é determinado a partir de:

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad (3.3)$$

onde I_{HV} e I_{HH} correspondem, respectivamente, às componentes vertical e horizontal para uma excitação por luz polarizada horizontalmente.

Os resultados de anisotropia são sempre analisados de acordo com a equação:

$$r_s = r_{s_2} + \frac{r_{s_1} - r_{s_2}}{1 + 10^{B' \left(\frac{T}{T_m} - 1 \right)}} \quad (3.4)$$

onde T e T_m correspondem, respectivamente à temperatura absoluta e à temperatura de transição de fase, r_{s_1} e r_{s_2} ao valor mais elevado e mais baixo, respectivamente, de anisotropia e B' relaciona-se ao factor de cooperatividade B .

Quando se está na presença de um ambiente membranar, a anisotropia de fluorescência vai depender da composição química e da fase em que a membrana se encontra. Por este motivo, a anisotropia de fluorescência é geralmente utilizada no estudo das propriedades e interações de diferentes moléculas com membranas. Quando fluoróforos se encontram incorporados em membranas, a anisotropia também permite estimar a viscosidade interna das membranas e o efeito da composição lipídica na temperatura de transição de fase. ^[61]

A anisotropia mede a restrição dos movimentos dos fluoróforos no ambiente membranar, embora normalmente se considere que a anisotropia mede a rotação de moléculas durante o tempo de vida do estado excitado. ^[61]

9.2.3.1. Sondas de fluorescência para estudos de anisotropia

Nos sistemas biológicos existem dois tipos de sondas (ou fluoróforos), as sondas intrínsecas como os resíduos de aminoácido presentes em proteínas ou, sondas extrínsecas, que consistem em moléculas fluorescentes adicionadas aos sistemas não fluorescentes como o caso dos lípidos. ^[61] Assim, torna-se necessário a adição de uma sonda de fluorescência extrínseca quando se pretende estudar as propriedades de uma membrana (como o caso dos lipossomas)

O DPH (1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno) e o TMA-DPH (1-(4-trimetilamoniofenil)-6-fenil-1,3,5-hexatrieno) têm vindo a ser das sondas de fluorescência extrínsecas mais utilizadas no estudo da estrutura e propriedades dinâmicas das membranas. ^[62, 69] O DPH, sendo uma molécula hidrofóbica, particiona-se completamente para a fase membranar, levando a que a sua fluorescência se verifique apenas na fase membranar e nunca em fase aquosa. ^[61]

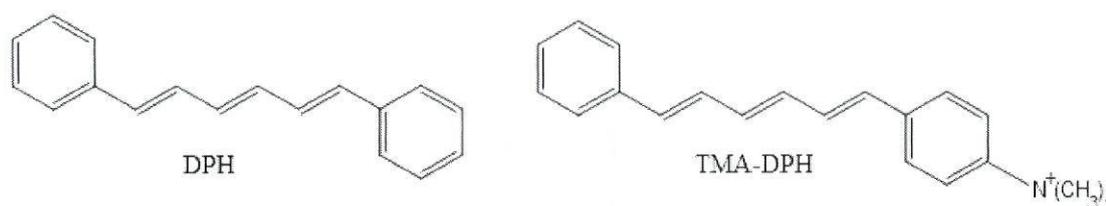


Figura 15 – Fórmulas de estrutura das sondas DPH e TMA-DPH.

A inserção de um grupo trimetilamonio num dos grupos fenil da molécula de DPH leva a uma menor hidrofobicidade da sonda e esta, quando adicionada a uma membrana, vai localizar-se perto da interface água/membrana. Deste modo, o grupo trimetilamonio encontra-se ligado às cabeças polares das membranas enquanto que a “cauda” DPH se encontra alinhada junto das cadeias hidrocarbonadas.

9.3. Determinação de constantes de associação

A fluorescência intrínseca das proteínas deve-se aos resíduos de triptofano presentes na estrutura proteica, que são extremamente sensíveis a alterações no ambiente em que se inserem. Alterações às suas características espectrais podem dever-se a várias alterações ambientais, tais como, a associação de ligandos à proteína e desnaturação entre outros. ^[47, 61]

Deste modo, a determinação de constantes de associação proteína/fármaco pode ser realizada a partir das diferenças de intensidade de fluorescência observadas para a proteína na ausência e presença de fármaco. A associação de uma proteína a um fármaco pode originar um aumento ou decréscimo da intensidade de fluorescência observada. O decréscimo da intensidade de fluorescência constitui uma extinção de fluorescência estática, dando origem a um complexo proteína/fármaco não fluorescente. Tratando-se de um fenómeno de extinção de fluorescência a equação a considerar para qualquer determinação é a constante de Stern-Volmer:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{PF} [F] \quad (3.5)$$

onde F_0 e F correspondem, respectivamente, à intensidade de fluorescência da proteína na ausência e presença de fármaco, $[F]$ a concentração molar do fármaco, e K_{PF} a constante para a extinção de fluorescência de Stern-Volmer, neste caso designada de constante de associação. A expressão de $\frac{F_0}{F}$ vs $[F]$ resulta numa relação linear, tal como numa extinção de fluorescência estática ou dinâmica, dependendo da grandeza do valor obtido para K_{PF} (um valor elevado sugere uma extinção estática, mais provável para uma situação em que exista associação entre moléculas presentes no sistema, enquanto que um valor pequeno implica uma extinção de fluorescência dinâmica).

No caso específico deste estudo, ao comprimento de onda de excitação da proteína o fármaco em estudo absorve radiação pelo que será necessário corrigir a intensidade de fluorescência observada para OmpF, de acordo com a equação (3.0). A absorvância da proteína é dada pela equação (3.5):

$$A = 6.\varepsilon[OmpF]\ell \quad (3.6)$$

onde ε representa a absorvidade molar do triptofano (ao comprimento de onda de excitação), $[OmpF]$ a concentração molar de proteína presente nos proteolipossomas e ℓ o percurso óptico da cuvette. Como cada monómero de OmpF possui 2 resíduos de triptofano e a proteína em si é um trímero é necessário multiplicar os factores mencionados por 6.

Uma vez que a proteína se encontra inserida em lipossomas não existirá apenas uma associação mas também existirá uma partição do fármaco na membrana lipídica

dos proteolipossomas. Assim, as constantes de associação também podem ser determinadas a partir de um ajuste não linear de acordo com a equação (3.7)

$$\Delta I = \frac{\Delta I_{\text{máx}} K_{PF} [F]}{1 + K_{PF} [F]} \quad (3.7)$$

9.4. Determinação da transposição membranar de fármacos mediada por canais iónicos

As bactérias Gram (-) necessitam de transportar os nutrientes essenciais ao seu desenvolvimento para dentro das suas células. Este fluxo de moléculas é feito através de porinas como OmpF. Estes canais permitem a passagem de iões e moléculas hidrofílicas de pequenas dimensões, que podem ser nutrientes ou moléculas com acção antibacteriana.^[35] Uma vez que os ambientes microbiológicos possuem uma elevada complexidade é frequentemente necessário reduzir o número de parâmetros de modo a compreender todo o seu mecanismo de funcionamento.^[29]

As **Bicamadas Lipídicas Planares (BLP)** constituem um sistema membranar mimético vantajoso, no estudo de proteínas membranares porque além de possuírem uma estrutura em bicamada permitem avaliar a função de transporte destas porinas.

Nos estudos da transposição membranar, uma das técnicas mais utilizadas baseia-se nas propriedades condutoras de corrente iónica destes canais porínicos.

9.4.1. Aplicação de BLP no estudo da condutividade iónica de canais porínicos

As bicamadas lipídicas planares, são preparadas de acordo com o método proposto por Montal e Mueller em 1972^[70] e consistem na deposição de monocamadas lipídicas num orifício presente num filme de teflon[®], de superfície hidrofóbica. As bicamadas são formadas pela remoção/reposição gradual do tampão presente nos compartimentos.^[70]

A reconstituição nas bicamadas é feita por adição de uma solução de proteína, contendo detergente acima da sua CMC, a um dos compartimentos da montagem. Embora o detergente se encontre acima da sua concentração micelar crítica, ao ser adicionado ao compartimento, que contém solução tampão, vai ser diluído para concentrações abaixo da sua CMC. Deste modo, a proteína deixa de estar associada ao detergente e a sua componente hidrofóbica fica exposta ao solvente aquoso. Neste caso,

a proteína pode agregar (precipitar) ou inserir-se na membrana dependendo da sua concentração. [29]

A grande vantagem da utilização de bicamadas lipídicas membranares face aos lipossomas é que, nas primeiras, é possível o acesso directo a ambos os compartimentos aquosos o que facilita uma manipulação da composição das soluções presentes em cada um. [70]

9.4.2. OmpF: Propriedades electrofisiológicas e difusão membranar

A inserção de uma molécula de proteína na bicamada planar verifica-se por um aumento da corrente iónica, como se pode observar na figura 15.

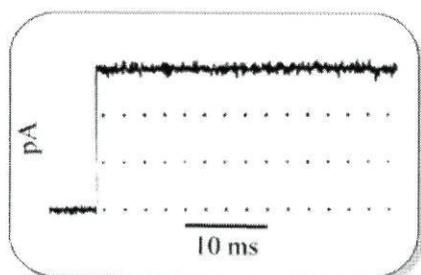


Figura 16 – Inserção de um trímero de OmpF. [71]

Na ausência de qualquer substrato no canal iónico de OmpF a corrente iónica mantém-se mais ou menos estável (oscila à volta de um valor médio). No entanto, sabe-se que existem diversas moléculas (antibióticos, nutrientes) que utilizam OmpF como canal de acesso ao interior da membrana externa das bactérias Gram (-). Neste caso, existem oscilações mais acentuadas à corrente iónica da porina, como se evidencia na figura 16. [73] Estas oscilações podem ser sinónimo de difusão pela porina ou de ligação (associação) do substrato ao interior do canal. [71]

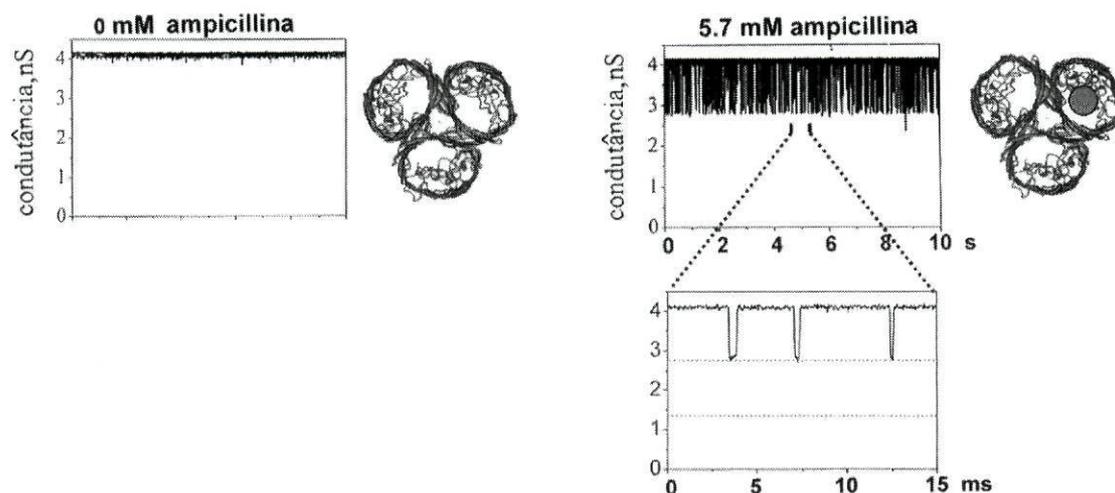


Figura 17 – Influência da permeação de um antibiótico (Ampicilina) na corrente iônica de OmpF. ^[71]

Uma análise estatística dos tempos característicos de bloqueio/desbloqueio do canal permite determinar as constantes cinéticas de associação/dissociação. ^[71] Para maior conveniência, as flutuações de corrente iônica em função do tempo são transformadas em amplitudes de frequência através de uma análise de densidade espectral. O traçado espectral das flutuações de corrente pode, deste modo, ser ajustado a uma função lorentziana (3.8): ^[72]

$$S(f) = \frac{S_0}{\left(1 + \left(\frac{f}{f_c}\right)^2\right)} \quad (3.8)$$

O ajuste, à função lorentziana $S(f)$, dos espectros permite a determinação da frequência angular f_c que se pode relacionar com o tempo médio de permeação do antibiótico, de acordo com a equação seguinte: ^[72]

$$\tau = \frac{1}{2\pi f_c} = \frac{1}{k_{ass}[c] + k_{diss}} \quad (3.9)$$

Capítulo III: Resultados e Discussão

Capítulo III: Os resultados

A resistência bacteriana tem vindo a tornar-se um dos assuntos mais recorrentes a nível de combate a infecções bacterianas nos humanos devido, sobretudo, ao uso abusivo e não controlado dos antibióticos disponíveis para terapia.

No entanto, na área veterinária, os antibióticos têm sido utilizados não só no tratamento de doenças desenvolvidas pelos animais mas também, em alguns casos, como promotores de crescimento. Assim, a resistência bacteriana pode chegar aos humanos, não só por via directa (administração abusiva de antibióticos) mas também via alimentação, água ou, simplesmente, por contacto directo com os animais.

O conhecimento do mecanismo pelo qual os antibióticos actuam é relativamente desconhecido, no entanto existem fortes provas que, além da mutação genética, uma das principais vias de resistência bacteriana é a impermeabilização das barreiras celulares aos antibióticos. Deste modo, torna-se necessário identificar e esclarecer os mecanismos de permeação de modo a produzir e adequar novas estruturas antibacterianas às mutações/alterações impostas pelas bactérias.

O presente estudo teve como objectivo o esclarecimento da via de permeação membranar da Enrofloxacina (uma quinolona de 2ª geração vastamente utilizada em medicina veterinária) não só pelo interesse de investigação do mecanismo, e a sua influência no desenvolvimento de resistência bacterianas mas, uma vez que é frequentemente utilizado, segundo a literatura consultada, como promotor de crescimento, o esclarecimento da extensão da sua permeação permite especular sobre a sua influência a nível da saúde humana, especialmente no sector alimentar.

Existem várias vias de permeação membranar: hidrofílica (através de canais denominados porinas), pela interface lípido/proteína ou simplesmente pela difusão do fármaco pela bicamada fosfolipídica. Assim, os estudos efectuados focaram cada uma dessas vias e a sua influência na permeação da Enrofloxacina.

1. Determinação de coeficientes de partição entre uma solução aquosa de Enrofloxacina e lipossomas de DMPC e DMPG

No estudo da interacção de qualquer composto com um modelo biomembranar a determinação do seu coeficiente de partição deve ser o primeiro passo. [75] A partição de moléculas entre uma solução aquosa e biomembranas é a base não só para a compreensão da extensão da interacção mas também do mecanismo de acção e transporte passivo dessa mesma molécula através de membranas. [63, 75]

Inicialmente, os estudos de partição eram realizados recorrendo a um sistema n-octanol/água e os resultados obtidos extrapolados para o sistema biomembrana/fase aquosa, uma vez que ambos possuíam uma fase apolar (octanol/membrana) e uma fase polar (água). No entanto esta extrapolação é uma simplificação do sistema real pelo que se passou a utilizar um sistema que mimetizasse uma biomembrana embora a nível farmacêutico, o sistema n-octanol/água ainda seja uma técnica bastante utilizada.

Os lipossomas, desde a sua descoberta, têm sido reconhecidos como modelos biomembranares úteis na previsão da interacção de fármacos com membranas biológicas devido à sua semelhança estrutural com as mesmas a vários níveis. [52, 76] Deste modo, a determinação das constantes de partição entre uma fase aquosa e uma fase membranar (lipossomas) pode ser um factor relevante na determinação da via de permeação do fármaco na membrana.

A fase membranar utilizada nos estudos realizados consistiu numa população homogénea de vesículas lipossómicas unilamelares de diâmetro médio de 100nm.

A espectrofluorimetria foi a técnica espectroscópica escolhida para a realização destes estudos por ser uma técnica que permite a utilização de baixas concentrações de fármaco, leva a uma pequena perturbação das vesículas e não é influenciada pela dispersão de luz causada pelos lipossomas.

A concentração de fármaco utilizada nos ensaios de espectrofluorimetria foi seleccionada de acordo com os intervalos de concentração (tabela 2) para a Enrofloxacina obtidos a partir da determinação da lei de Lambert-Beer para o fármaco, em tampão Hepes, com base nos efeitos de filtro interno avaliados para a Enrofloxacina.

	Concentração (μM)
Espectrofotometria de UV-Vis	2,22 – 28,0
Espectrofluorimetria	2,22 – 11,1

Tabela 2 – Intervalos de concentração de Enrofloxacina, em tampão Hepes, para os quais é válida a lei de Lambert-Beer, e não se verificam efeitos de filtro interno.

1.1. Determinação de Kp's por Espectrofluorimetria

A aplicação da espectroscopia de fluorescência na determinação de coeficientes de partição é possível visto a Enrofloxacina possuir propriedades fluorescentes.

A presença de estruturas micro-heterogêneas causa turbidez, o que provoca dispersão de luz, sobretudo a comprimentos de onda inferiores a 400nm. Esta dispersão de luz leva a um aumento da absorvância onde não existam cromóferos a absorver radiação o que leva a uma diminuição da luz que atinge o detector. No caso das partículas serem menores que o comprimento de onda (λ), temos dispersão de Rayleigh que é inversamente proporcional à quarta potência de λ . [77-80] Uma vez que o λ_{em} da enrofloxacina se encontra a 414nm a contribuição das interferências espectrais, devido à presença da suspensão lipossômica, não é significativa pelo que não se efectuou a subtração das amostras de referência (amostras da suspensão lipossômica de DMPC e DMPG de concentração crescente) aos resultados obtidos.

As propriedades de um fluoróforo dependem fortemente do meio envolvente pelo que alterações verificadas a essas propriedades permitem a determinação do coeficiente de partição uma vez que existem dois meios distintos nos quais o fluoróforo se pode particionar.

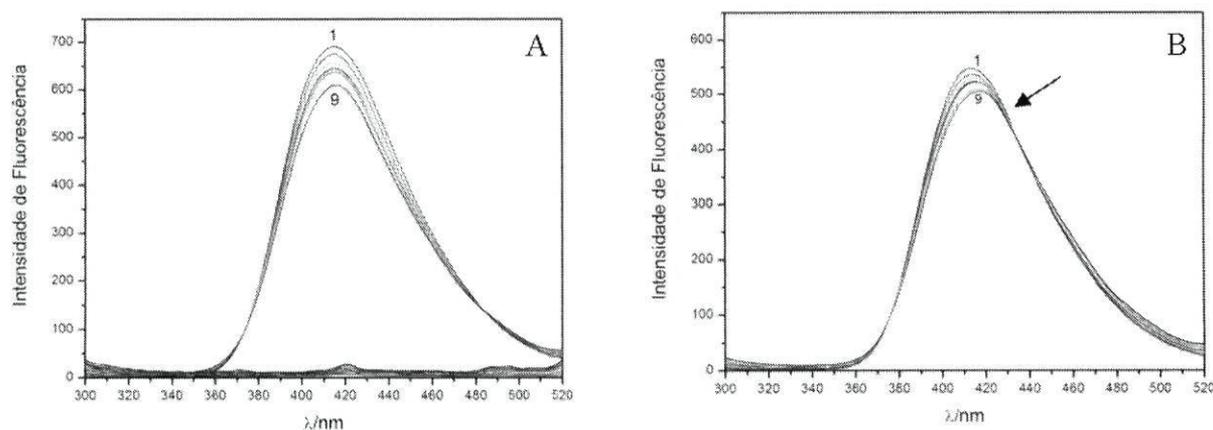


Figura 18 – Espectro de emissão da Enrofloxacina (7,4 μ M) na ausência (1) e presença de suspensão de (A) DMPC e (B) DMPG de concentração crescente (2 a 8). Concentrações de DMPC (μ M): (2) 106, (3) 211, (4) 338, (5) 436, (6) 551, (7) 634, (8) 739, (9) 845 e DMPG (μ M) (2) 88, (3) 165, (4) 243, (5) 248 (6) 413, (7) 496, (8) 578, (9) 661.

Como se pode observar, o espectro de fluorescência da Enrofloxacina sofre ligeiras alterações à medida que se aumenta a concentração de DMPC ou DMPG. A diminuição da intensidade de fluorescência indica que, a concentração de fármaco presente na fase aquosa é menor à medida que a concentração da fase lipídica aumenta, o que demonstra um certo nível de partição entre as duas fases.

Em DMPC observa-se, unicamente, um decréscimo da sua intensidade de fluorescência enquanto que para DMPG, além do decréscimo verificado existe ainda um ligeiro deslocamento do comprimento de onda máximo de emissão a partir de determinada concentração de lípido que dá origem a um ponto isobéstico (indicado pela seta). Embora o deslocamento seja muito pequeno (2nm) e não provoque diferenças significativas a nível do valor obtido para o coeficiente de partição, a presença do isobéstico indica a existência do fármaco, em simultâneo, em dois estados distintos: livre, na fase aquosa de tampão Hepes, e outro em que o fármaco se encontra associado à bicamada fosfolipídica

A determinação dos coeficientes de partição foi feita por ajuste não linear da equação (1.2) aos valores experimentais obtidos, e representada graficamente por $(IF_0 - IF) \text{ vs } [\text{Lípido}]$. Os valores de IF_0 e IF correspondem, respectivamente, à intensidade de fluorescência da enrofloxacina em tampão hepes e na presença de concentrações crescentes de lípido, ao comprimento de onda máximo de 414nm.

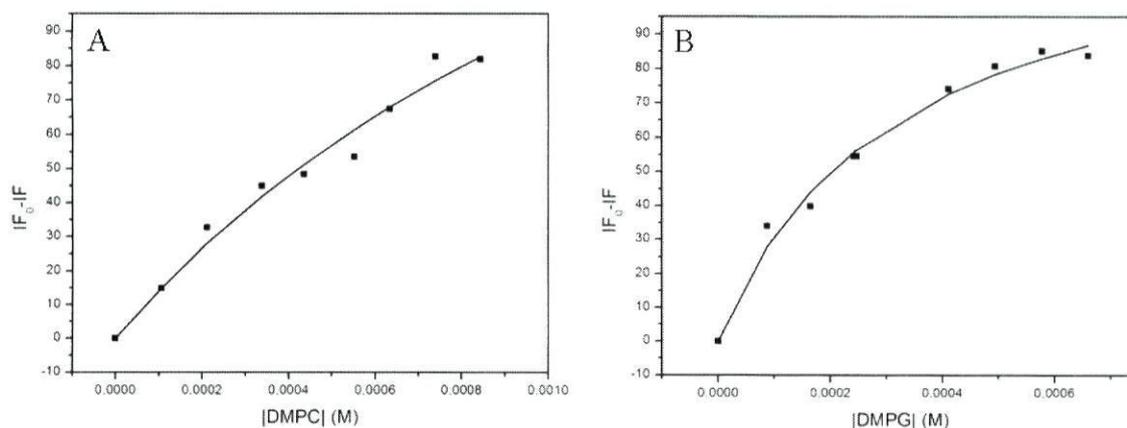


Figura 19 – Ajuste não linear da equação (1.2) aos valores experimentais obtidos ao λ máximo de emissão (414nm) da Enrofloxacina, para concentrações crescentes de (A) DMPC e (B) DMPG.

Os valores de K_p obtidos para DMPC e DMPG, por espectrofluorimetria, encontram-se resumidos na tabela 3. Os resultados apresentados correspondem à média e respectivo desvio padrão dos diferentes ensaios realizados.

	DMPC	DMPG
$K_p (M^{-1})$	1139±473	2234±519

Tabela 3 – Coeficientes de partição, entre uma fase aquosa e uma fase lipídica de DMPC e DMPG, para Enrofloxacina obtidos por espectrofluorimetria.

Os valores de K_p obtidos para DMPG (tabela 3) são superiores aos obtidos para vesículas de DMPC, pelo que supõe uma maior interacção do antibiótico com vesículas carregadas negativamente.

1.2. Localização membranar da fluoroquinolona Enrofloxacina em LUV's de DMPC e DMPG

A determinação dos coeficientes de partição permite uma abordagem quantitativa sobre a interacção da enrofloxacina com estruturas miméticas biomembranares, na medida em que é possível a sua quantificação através do valor de coeficiente de partição no entanto, não permite identificar a localização do fármaco.

Para um melhor esclarecimento sobre esta interacção e sobre o papel da fase lipídica no mecanismo de acção do fármaco em estudo, é necessário recorrer a outro tipo de ensaios que nos permitam saber qual a zona membranar onde a interacção ocorre, de modo a poder determinar se esta ocorre a um nível superficial devido a

orientação molecular e consequente adsorção da molécula à fase lipídica ou se efectivamente o fármaco se difunde através da bicamada localizando-se numa zona mais profunda da membrana.

1.2.1. Extinção de Fluorescência da Enrofloxacina pelo Ião Iodeto

A aplicação de fenómenos de extinção de fluorescência permite determinar a acessibilidade do agente extintor ao fármaco (determinando deste modo a sua localização), determinação da partição do agente entre uma fase aquosa e a membrana entre outros fenómenos. ^[61] O agente extintor escolhido para os ensaios de localização membranar da Enrofloxacina foi o ião iodeto por ser um ião hidrossolúvel e cujo efeito nas propriedades fluoróforas do fármaco se faz sentir, fundamentalmente, na fracção disponível na fase aquosa no entanto, existem casos documentados em que o ião iodeto actua sobre fluoróforos presentes em membranas. ^[61]

O intervalo de concentrações de KI seleccionado (0,007 a 0,220 M) permite-nos uma observação do fenómeno de extinção de fluorescência da Enrofloxacina sem, contudo, induzir alterações na estrutura lipídica utilizada que geralmente se verificam para concentrações elevadas de KI. ^[81]

A extinção de fluorescência da enrofloxacina na ausência e presença de vesículas lipossómicas (DMPC e DMPG) foi observada pela diminuição da intensidade de fluorescência, por adição de concentrações crescentes de ião iodeto. O processo de extinção também foi seguido por espectrofotometria de UV-Vis, para observação do espectro de absorção das espécies envolvidas.

Na figura 20 encontram-se representados os espectros de UV-Vis e da variação da intensidade de fluorescência por extinção da fluorescência pelo ião iodeto, na ausência e presença de vesículas unilamelares de DMPC e DMPG.

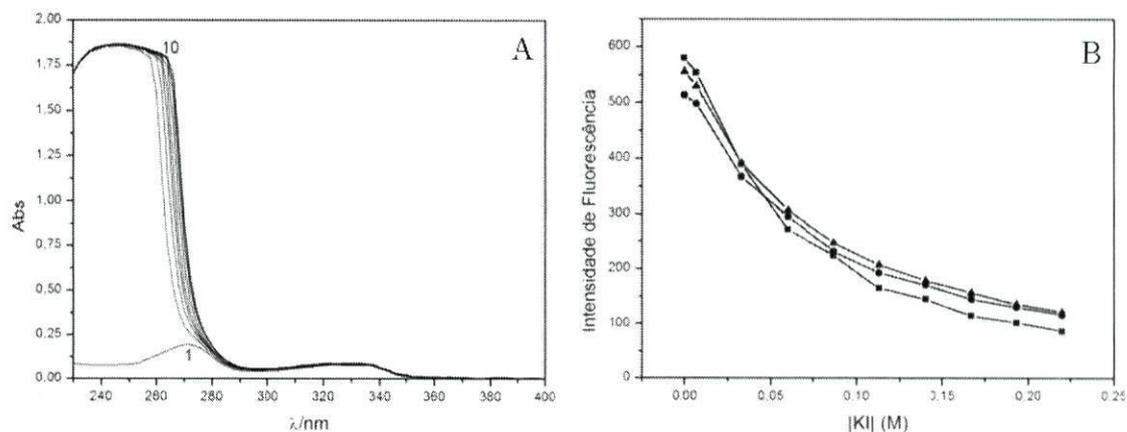


Figura 20 – (A) Espectro de UV-Vis da Enrofloxacina ($7,4\mu\text{M}$) na ausência (1) e presença (2 a 10) de concentrações crescentes de KI e (B) variação da intensidade de fluorescência corrigida da Enrofloxacina ($7,4\mu\text{M}$) em função da concentração de KI na ausência (■) e presença de $500\mu\text{M}$ de (●) DMPC e (▲) DMPG.

Observando o espectro de UV-Vis representado é possível observar que, ao comprimento de onda de absorção do fármaco (272nm) existem duas espécies que absorvem radiação: a enrofloxacina e a solução de KI. Assim, os resultados experimentais obtidos terão de ser corrigidos quanto à intensidade de fluorescência observada, de acordo com a equação (3.0).

Também é possível observar que à medida que se aumenta a concentração de ião iodeto se verifica um decréscimo na intensidade de fluorescência observada para a Enrofloxacina tanto na ausência como na presença de componente lipídica. Apesar de existir um decréscimo em todas as situações, este é mais acentuado para a Enrofloxacina na ausência de lipossomas, como seria de esperar, uma vez que o ião iodeto é hidrossolúvel e o antibiótico se encontra em solução aquosa, embora para concentrações baixas de KI não seja possível uma observação tão clara desse decréscimo. Esta variação de intensidade de fluorescência entre a enrofloxacina livre e incorporada em lipossomas deve-se à partição do fármaco pelas diferentes fases presentes.^[81] Na ausência de lipossomas, a acessibilidade do ião iodeto ao fármaco é quase total, enquanto que quando existe partição entre a fase aquosa e os lipossomas existirá uma fracção de moléculas inacessível ao agente de extinção. A existência de uma fracção de fármaco não acessível ao agente de extinção sugere a permeação de parte do antibiótico para uma parte mais interna da bicamada.

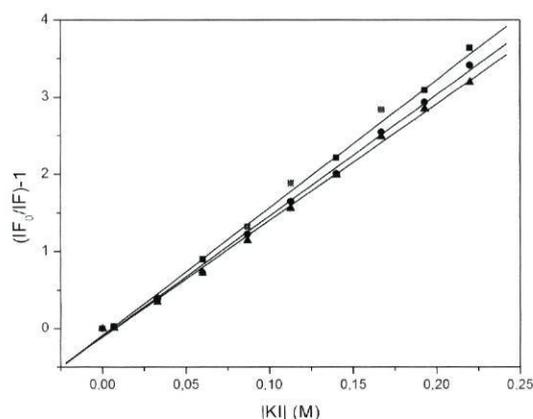


Figura 21 – Representação gráfica da equação de Stern-Volmer, equação (2.0), para a extinção de fluorescência da Enrofloxacin em função da concentração de KI na ausência (■) e presença de 500μM de (●) DMPC e (▲) DMPG. Comprimento de onda de excitação 272nm e emissão a 314nm.

A existência de uma componente lipídica induz uma diminuição nos valores da constante de Stern-Volmer, na seguinte ordem:

$$K_{SV} \text{ Enrofloxacin}_{(Hepes)} > K_{SV} \text{ Enrofloxacin}_{(DMPC)} > K_{SV} \text{ Enrofloxacin}_{(DMPG)}$$

A ordem observada corrobora os resultados obtidos para a partição entre o fármaco e as vesículas lipossômicas pois uma vez que quanto maior for a partição da quinolona na fase membranar menor será o valor da constante de Stern-Volmer.

As constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) para a extinção da Enrofloxacin pelo ião iodeto são determinadas a partir do declive da recta, obtido por representação gráfica de $(IF / IF_0) - 1 = f(|KI|)$, onde IF é a intensidade de fluorescência corrigida para a enrofloxacin e IF_0 a intensidade de fluorescência da Enrofloxacin na ausência de KI.

Os valores de K_{SV} determinados a partir da equação (2.0) estão representados na tabela seguinte e correspondem ao valor médio e respectivo desvio padrão para cada conjunto de ensaios realizados (ausência e presença de diferentes composições lipídicas). As rectas representadas, para cada uma das variáveis, foram obtidas com um coeficiente de correlação igual a 0,999.

	$K_{SV} (M^{-1})$	
	DMPC	DMPG
0μM	16,6±0,3	
500μM	16,2±0,2	15,3±0,2
750μM	16,1±0,2	15,1±0,2

Tabela 4 – Valores da constante de Stern-Volmer para a extinção de fluorescência da Enrofloxacin pelo ião iodeto, na ausência e presença de LUV's de DMPC e DMPG.

No caso de LUV's de DMPC verifica-se um decréscimo muito pouco acentuado dos valores de K_{SV} provavelmente devido a uma pequena redução da concentração de enrofloxacina em solução aquosa por partição do fármaco para a fase membranar. No entanto, para LUV's de DMPG observa-se um decréscimo mais acentuado nos valores das constantes de Stern-Volmer o que indica uma maior ligação da fluoroquinolona aos lípidos carregados negativamente. Embora se previsse uma repulsão electrostática entre o ião iodeto e as cabeças polares do fosfolípido devido à carga negativa em comum, esta será superada não só devido ao facto da bicamada fosfolipídica se encontrar acima da sua temperatura de transição mas também devido à repulsão electrostática entre as cabeças polares (grupos glicerol) de DMPG, factores estes responsáveis por um menor empacotamento do fosfolípido. [78, 82]

Caso o iodeto se difundisse na membrana verificar-se-iam alterações no tamanho e estrutura dos lipossomas. [66, 82] Estas modificações a nível membranar podem ser avaliadas através da análise dos tamanhos dos lipossomas, por dispersão de luz, na presença e ausência de KI. Um aumento no índice de polidispersão dos lipossomas implicaria um aumento do tamanho das vesículas em suspensão o que evidenciaria alterações à sua estrutura.

Deste modo, procedeu-se à análise, por dispersão de luz, de algumas das fracções intervenientes na determinação das constantes de Stern-Volmer.

Na tabela 5 encontram-se resumidos o tamanho dos lipossomas na ausência e presença de 0,220M de KI.

KI (M)	DMPC		DMPG	
	0 M	0,220 M	0 M	0,220 M
Tamanho médio (nm)	114	115	109	99
Índice de polidispersão	0,09	0,11	0,09	0,10

Tabela 5 – Tamanho médio dos lipossomas, na presença de Enrofloxacina, na ausência e presença de 0,220M de KI.

Como se pode observar pelos valores apresentados, não existem alterações significativas, tanto no tamanho como na polidispersão dos lipossomas e, portanto, pode concluir-se que o ião iodeto não se difunde na membrana e que a extinção de fluorescência do fármaco pelo mesmo é feita na interface membranar.

1.3. Conclusões

A interacção da Enrofloxacina com lipossomas de DMPC e DMPG, isto é, com lipossomas de diferente composição lipídica reflecte uma maior partição para a fase lipídica, do que aquela reportada para a Ciprofloxacina (sua análoga). A introdução de um grupo etilo na posição 4 do anel piperazínico influencia, certamente, as suas propriedades físico-químicas levando a uma maior interacção com as vesículas lipossómicas, por ser um grupo mais lipofílico do que o hidrogénio presente na estrutura molecular da Ciprofloxacina. Esta maior partição era de esperar uma vez que todos os estudos, documentados, sobre a partição n-octanol/água da CIPRO e seus análogos sugerem que os compostos com alterações na posição 4 no anel piperazínico evidenciam uma maior intensidade de partição para fases apolares (como é o caso da bicamada fosfolipídica).

Os resultados de partição estão de acordo com os resultados obtidos para os estudos de localização membranar pois ambos sugerem a existência de uma interacção entre a fluoroquinolona e a bicamada lipídica. De um modo geral, as quinolonas interagem sobretudo ao nível da interface bicamada/água (zona das cabeças polares dos fosfolípidos) verificando-se interacções maiores na presença de lípidos carregados negativamente, como o DMPG, o que indicará uma interacção electrostática entre o lípido e a enrofloxacina.

Avaliando o comportamento da Enrofloxacina, é possível especular sobre o modo como a quinolona interage com bicamadas fosfolipídicas. Assim, numa fase inicial existirá uma adsorção, puramente electrostática, à bicamada que será um passo fundamental para o desenvolvimento da acção antibacteriana do fármaco mas, estes estudos, não são suficientes para explicar o mecanismo de acção da ENR.

As alterações estruturais da Enrofloxacina não se verificam, unicamente, a nível do aumento da sua componente hidrofóbica (a inserção do grupo etilo) mas também sofreu alterações ao seu comportamento ácido-base, quando comparada com a Ciprofloxacina ($pK_{a1}=6,08\pm 0,11$ e $pK_{a2}=8,58\pm 0,55$)^[13], uma vez que as constantes de acidez possuem valores diferentes, sobretudo para pK_{a2} (Enrofloxacina: $pK_{a1}=6,12\pm 0,05$ e $pK_{a2}=7,68\pm 0,42$) o que poderá influenciar o seu comportamento na presença de vesículas carregadas negativamente.^[13]

2. Reconstituição da proteína membrana OmpF

Os proteolipossomas são frequentemente utilizados como modelos membranares no sentido de esclarecer a estrutura e função de proteínas membranares, pois a complexidade do ambiente microbiológico torna difícil o seu estudo *in situ*. No entanto, é necessário obedecer a um certo número de condições sendo as mais importantes uma distribuição homogênea de tamanhos e de proteína, pelos lipossomas, assim como uma actividade biológica elevada.

Existem vários métodos de inserção de proteínas em lipossomas como meios mecânicos, congelação/dcongelação, reconstituição mediada por solventes orgânicos ou mediada por detergentes. Embora estas técnicas sejam úteis na preparação de vesículas lipídicas, a inserção de uma proteína membrana, durante o processo de reconstituição, impõe algumas restrições e impede a aplicabilidade das vesículas fosfolipídicas na reconstituição dos proteolipossomas, pois a maior parte das proteínas membranares é purificada recorrendo ao uso de detergentes o que vai interferir com o processo de formação dos lipossomas.

Embora a presença de detergentes interfira com os lipossomas, a maior parte das técnicas utilizadas para a reconstituição de proteínas em vesículas lipossómicas envolvem detergentes de modo a preservar a actividade biológica da proteína. O processo de reconstituição tradicional, envolve a co-micelização da proteína com lípido em excesso e um detergente apropriado. Após este passo, o detergente é removido levando à formação progressiva de vesículas fechadas nas quais se encontra inserida a proteína (proteolipossomas).^[57]

Dentro das reconstituições mediadas por detergente as abordadas, neste estudo, são a reconstituição por incorporação em lipossomas pré-preparados (diluição da mistura detergente-proteína em suspensão lipossómica) e reconstituição por cromatografia de exclusão. A figura 22 representa os diferentes processos de reconstituição de proteínas mediados por detergente.

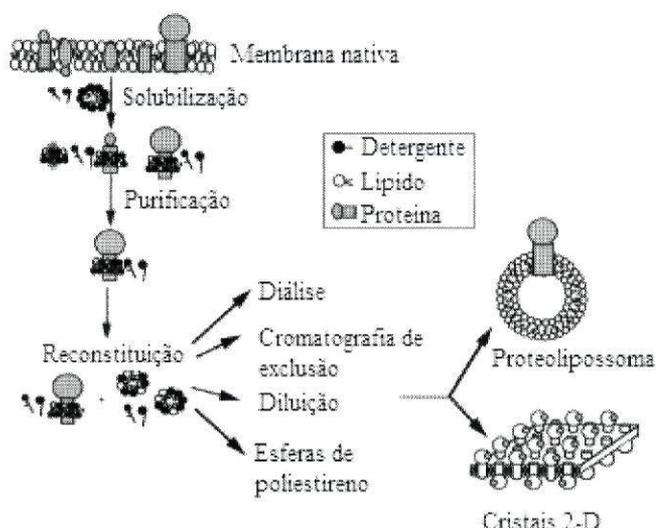


Figura 22 – Estratégias de reconstituição mediadas por detergente desde a extracção da proteína da sua membrana nativa à sua reconstituição. [57]

A literatura existente sobre os processos de reconstituição refere que reconstituições realizadas a partir de misturas micelares de detergente produzem proteolipossomas de diferentes tamanhos e composições e os factores que, geralmente influenciam estas propriedades são a natureza do detergente, o processo de remoção do mesmo, a natureza da proteína e a composição lipídica. [57]

Os estudos de reconstituição membranar de OmpF em lipossomas foram realizados utilizando, como componente lipídica, fosfolípidos de DMPC e a análise dos tamanhos dos proteolipossomas, por dispersão de luz, é importante para determinar quais os factores que influenciam o processo de reconstituição.

A composição lipídica utilizada, DMPC, prende-se com o facto da sua cadeia hidrocarbonada ser saturada e composta por 14 carbonos e, se assemelhar bastante à componente lipídica do LPS (lipopolissacarídeo), que se encontra na membrana externa das bactérias Gram (-). [46]

2.1. Reconstituição em lipossomas pré-preparados por Cromatografia de Exclusão

Este estudo teve como objectivo a inserção da proteína membranar OmpF por cromatografia de exclusão sobretudo por ser uma técnica simples, de rápida execução e, teoricamente, eficiente na remoção de detergente. [59]

O processo de reconstituição envolve a co-micelização da proteína, na presença de lipídeo em excesso, formando uma mistura lípido-proteína-detergente e micelas detergente-lípido, pois ao adicionar a proteína (que vem solubilizada em detergente) aos lipossomas já preparados estes vão se solubilizar, devido à presença de oPOE

(detergente) e formar micelas mistas. A cromatografia de exclusão permite a separação do material não encapsulado e do detergente presente na mistura proteína-detergente-lipossoma e a obtenção quase imediata das vesículas. [59]

No entanto, esta técnica também traz desvantagens: diluição das vesículas e material encapsulado, possibilidade de retenção do material no gel, o não conhecimento da exactidão da diluição exacta e dos factores de retenção o que torna a cromatografia de exclusão uma técnica semi-quantitativa. [59]

Para os estudos com proteolipossomas, após a recolha de todas as amostras passadas pela coluna de gel Sephadex, foram seleccionadas as amostras que possuíam lipossomas (zona indicada com a seta na figura 23) e com maior intensidade de fluorescência, o que indicará uma maior concentração de proteína.

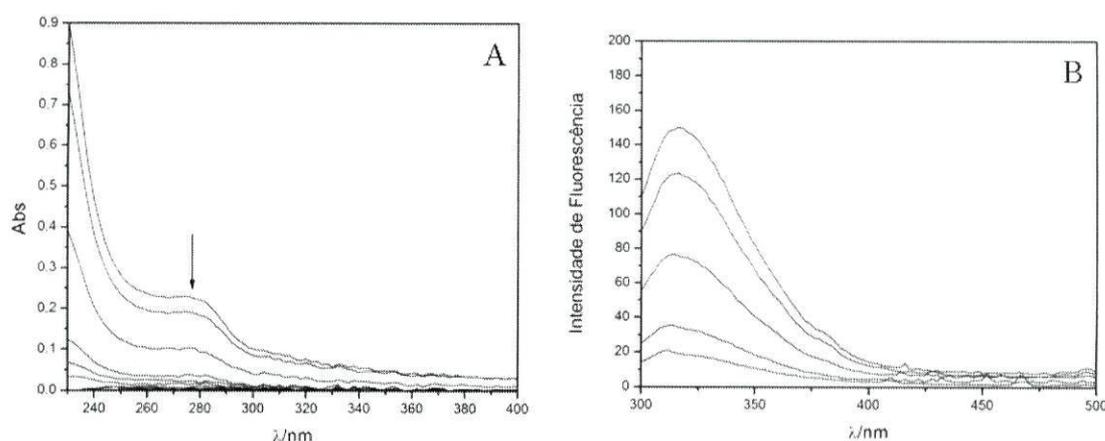


Figura 23 – Espectro de (A) UV-Vis das amostras retiradas da coluna de exclusão e (B) espectro de Fluorescência das amostras que apresentam, no espectro de UV-Vis, sinal de terem presente lipossomas e proteína. Concentração na mistura de OmpF e DMPC: 0,86mM e 2,0mM, respectivamente.

Como já foi referido, a natureza do detergente pode, segundo a literatura, influenciar o tamanho e a composição dos proteolipossomas obtidos. A literatura consultada refere, ainda, que quando se utiliza oPOE a proteína será directamente incorporada nos lipossomas saturados com detergente. [57]

As percentagens de encapsulação de OmpF nos lipossomas foram determinadas com base nos doseamentos de proteína efectuados às fracções recolhidas, pelo método do ácido bicinonínico.

A partir dos valores obtidos para cada fracção e, sabendo o volume de cada alíquota, é possível determinar o número de moles de OmpF em cada fracção, e somando todas essas fracções, obtém-se o número de moles total de OmpF sendo

possível, deste modo, a determinação da percentagem de encapsulação de OmpF nos lipossomas e assim, verificar a eficácia da reconstituição por cromatografia de exclusão.

O que se verificou é que, ao longo dos ensaios efectuados, a percentagem de encapsulação obtida varia entre 60% e 94%, o que poderá comprometer a reprodutibilidade da técnica, embora as percentagens obtidas sejam relativamente elevadas. Na origem destas alterações podem estar fluxos diferentes ou alterações no empacotamento da coluna.

2.1.2. Caracterização de proteolipossomas por dispersão de luz

Processos de reconstituição membranar a partir de misturas micelares levam a uma variedade de tamanhos e composição dos proteolipossomas devido à presença de detergente ^[58], como já foi mencionado. Assim, torna-se necessário determinar quais os tamanhos de vesículas presentes nas fracções recolhidas de modo a obedecer às condições essenciais para a obtenção de uma boa reconstituição membranar.

A análise, por dispersão de luz, do tamanho das estruturas obtidas permite-nos avaliar o diâmetro das vesículas de modo a poder realizar futuros ensaios com uma população o mais homogénea possível e com cerca de 100nm de diâmetro.

A figura 24 representa a distribuição de tamanhos de uma suspensão lipossómica de DMPC preparada por extrusão e de proteolipossomas reconstituídos por cromatografia de exclusão.

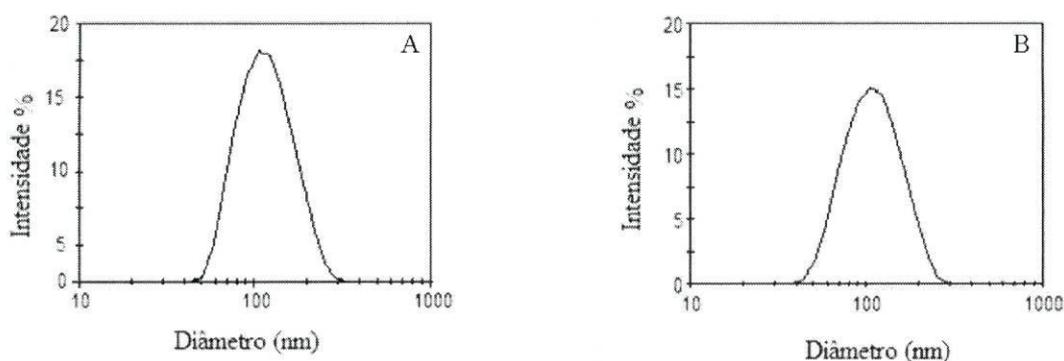


Figura 24 – Distribuição de tamanho de (A) lipossomas preparados por extrusão e (B) proteolipossomas preparados por cromatografia de exclusão (fracção mais concentrada).

Na tabela 6 encontram-se resumidos os valores médios para o tamanho e polidispersão das estruturas presentes nas fracções, mais concentradas, recolhidas. As fracções mais concentradas foram as fracções utilizadas em todos os ensaios que se efectuaram posteriormente.

	Tamanho médio (nm)	Polidispersão
Lipossomas	109	0,11
Proteolipossomas	112	0,25

Tabela 6 – Tamanho médio dos proteolipossomas obtidos por cromatografia de exclusão.

A distribuição de tamanhos obtida para os lipossomas (preparados por extrusão) vai de encontro ao esperado perante a técnica de preparação utilizada (ver metodologia experimental) tendo as vesículas um tamanho médio de 109nm. No que diz respeito aos proteolipossomas, os estudos de dispersão de luz foram realizados nas fracções (mais concentradas) utilizadas em todos os estudos sendo o seu valor médio de cerca de 112nm.

Estes resultados permitem-nos verificar que a metodologia de reconstituição por cromatografia de exclusão origina proteolipossomas de diâmetro médio ~100nm e que não existe detergente presente nas fracções recolhidas para a realização dos ensaios, uma vez que, como se pode observar (figura 24) temos uma única população presente na amostra.

2.1.3. Caracterização de proteolipossomas por Anisotropia de Fluorescência

As membranas biológicas possuem uma vasta diversidade de proteínas e ambientes lipídicos.

Qualquer proteína integral possui um domínio hidrofóbico, assim como as bicamadas fosfolipídicas estão dotadas de uma espessura hidrofóbica, directamente relacionada com o tamanho das cadeias hidrocarbonadas. Uma vez que a exposição de qualquer destes domínios hidrofóbicos a uma fase aquosa é desfavorável do ponto de vista energético, calcula-se que o dispêndio de energia será menor se houver uma compatibilidade de dimensões entre a proteína e a bicamada. ^[83] Se existir um desajuste hidrofóbico entre os domínios da proteína e do lípido existirão, sem dúvida, consequências a nível da organização dos lípidos.

Assim, uma proteína, ao entrar em contacto com uma bicamada vai afectar a sua ordenação estrutural, tornando-a mais fluida ou mais rígida, consoante o tamanho do domínio hidrofóbico da proteína. Estas alterações podem verificar-se nos lípidos adjacentes à proteína ou, se de maior dimensão, podem estender-se a várias camadas de lípido até que a bicamada retorne à sua organização estrutural normal. ^[83, 84]

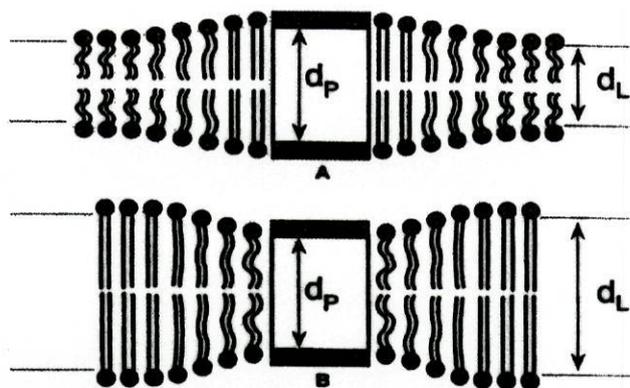


Figura 25 – Representação esquemática [83] da inserção de uma proteína de comprimento hidrofóbico d_p em bicamadas fosfolipídicas de espessura d_L onde, a espessura hidrofóbica d_L é menor (A) ou maior (B) que d_p .

A variação da anisotropia, em função da temperatura, das sondas DPH e TMA-DPH incubadas/incorporadas em lipossomas de DMPC e proteolipossomas DMPC/OmpF encontra-se representada na figura 26.

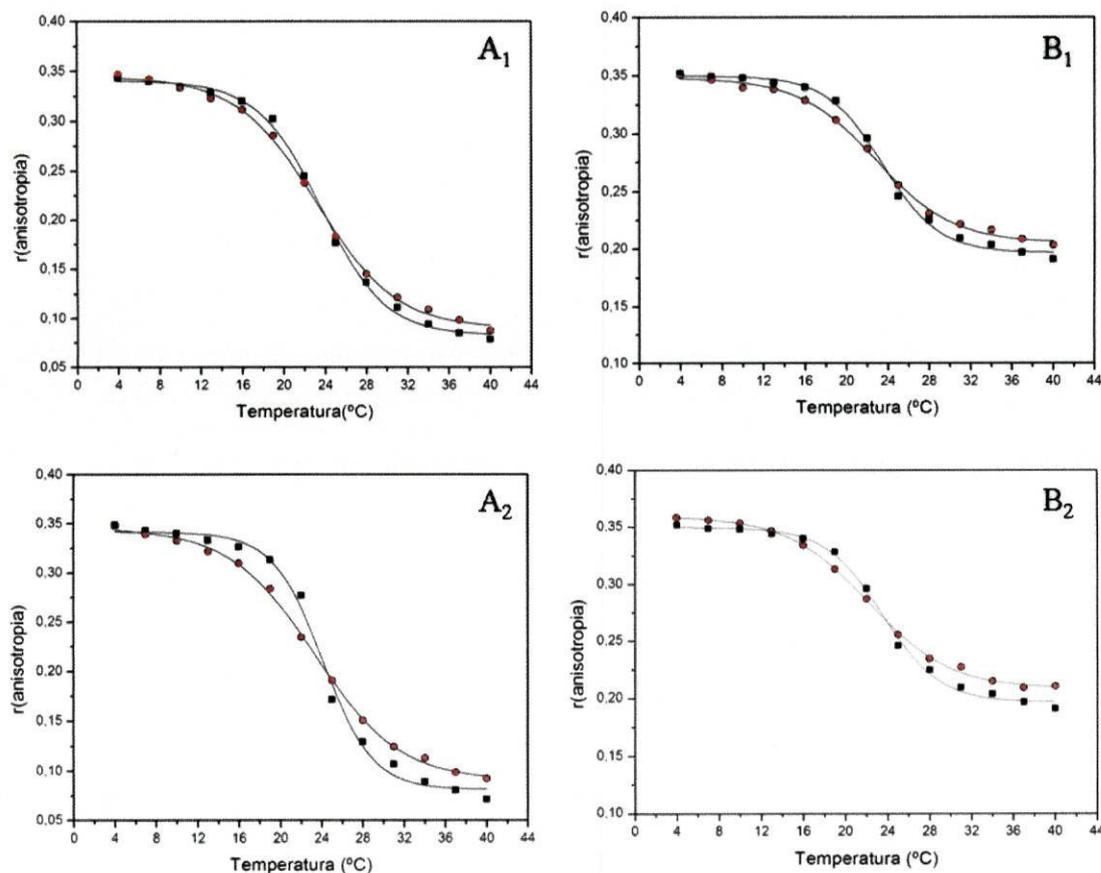


Figura 26 – Variação da anisotropia de fluorescência, em função da temperatura, das sondas de fluorescência (A) DPH e (B) TMA-DPH para (■) LUV's de DMPC e (●) proteolipossomas (A₁) e (B₁) por incubação e (A₂) e (B₂) por incorporação.

O objectivo de estudar a variação da anisotropia de fluorescência de lipossomas e proteolipossomas por incubação ou incorporação das sondas prende-se com o intuito

de verificar se existem alterações significativas no comportamento das vesículas por estes dois métodos de interação entre as sondas e os (proteo)lipossomas. Como se pode observar, o comportamento das vesículas, por incubação ou incorporação, é bastante semelhante entre as sondas assim como as suas temperaturas de transição (os valores obtidos não diferem significativamente).

No entanto, avaliando os perfis de variação de anisotropia de proteolipossomas e lipossomas de DMPC, verificam-se diferenças claras em termos do comportamento das vesículas. Convém mencionar que uma vez que a razão molar OmpF:DMPC é, aproximadamente, 1:1000, as variações observadas correspondem às sondas e não por proximidade destas da proteína ^[45] e, portanto, o comportamento observado deve-se unicamente a alterações na estrutura lipídica.

Embora para a sonda DPH o perfil para os lipossomas esteja de acordo com o conhecido para os lipossomas, com um acentuado decréscimo da anisotropia e com uma temperatura de transição de fase (T_m) de acordo com a esperada (cerca de 23°C), para a sonda TMA-DPH o decréscimo não é tão abrupto quanto o observado para a sonda DPH mas, no entanto, a T_m observada encontra-se dentro do erro experimental, sendo a diferença de valor muito pouco significativa. Para os proteolipossomas, o perfil já é bastante diferente, sendo a anisotropia menor antes de T_m (fase gel) e superior aos lipossomas para valores acima da T_m (fase fluida) para ambas as sondas. Os valores de T_m também variam ligeiramente, quando comparados com os valores obtidos para os lipossomas, sobretudo para a sonda TMA-DPH. Comparando as variações de anisotropia sofridas por inserção de OmpF, verifica-se que o aumento de anisotropia sentido após T_m , embora seja pequeno, foi maior por parte da sonda DPH ($\Delta r=0,02$) do que pelo TMA-DPH ($\Delta r=0,01$).

	Incubação		Incorporação	
	Lipossomas	Proteolipossomas	Lipossomas	Proteolipossomas
	$T_m(^{\circ}\text{C})$	$T_m(^{\circ}\text{C})$	$T_m(^{\circ}\text{C})$	$T_m(^{\circ}\text{C})$
DPH	23,7±0,2	23,2±0,2	24,1±0,3	23,3±0,2
TMA-DPH	23,5±0,2	22,9±0,3	23,5±0,2	22,2±0,2

Tabela 7 – Valores de temperatura de transição para lipossomas de DMPC e proteolipossomas OmpF/DMPC, obtidos por ajuste dos resultados à equação (3.4).

Relativamente às temperaturas de transição verifica-se que, após a inserção da proteína OmpF, existe um decréscimo de T_m para ambas as sondas sendo, no entanto, esse decréscimo ligeiramente mais acentuado para TMA-DPH ($\Delta T=0,6^\circ\text{C}$) do que para DPH ($\Delta T=0,5^\circ\text{C}$).

Sabendo que a anisotropia de fluorescência fornece informação sobre o comportamento de proteínas e moléculas, num determinado ambiente, pode-se especular sobre os efeitos da inserção de OmpF nos lipossomas de DMPC. Abaixo de T_m , os valores de anisotropia (r) para os proteolipossomas são inferiores aos das vesículas de DMPC, pelo que se pressupõe que a sonda inserida tem maior facilidade de rotação dentro da membrana e que, conseqüentemente, OmpF levou a uma menor rigidez da estrutura membranar (verificado a partir de 13°C). Para valores acima de T_m , a inserção de OmpF na bicamada provocou uma maior ordenação da membrana, daí os valores mais elevados de r . Ambas as situações foram verificadas para as duas sondas havendo, no entanto, pequenas alterações entre elas. Contudo, o facto de T_m diminuir para a sonda TMA-DPH, sugere um decréscimo da ordem estrutural na zona da interface aquosa.

Quando uma proteína entra em contacto com uma bicamada lipídica, esta pode alterar a estrutura da membrana tornando-a mais rígida ou mais fluida consoante o tamanho da camada hidrofóbica da proteína é, respectivamente, menor ou maior. Uma vez que o valor médio da espessura da bicamada na fase gel é $3,15\pm 0,1\text{nm}$ e na fase fluida é $2,3\pm 0,1\text{nm}$ (de onde resulta o valor médio de $2,8\pm 0,6\text{nm}$) e para OmpF é de $2,4\text{nm}$,^[85] constata-se que OmpF tem um tamanho de camada hidrofóbica menor que DMPC^[83, 84] levando, como já foi referido, a uma maior rigidez da bicamada lipídica aquando da sua inserção. Estas perturbações vão provocar alterações na temperatura de transição de fase dos lípidos e também, como se verifica, vão influenciar os valores de anisotropia de fluorescência, justificando, deste modo, os valores observados. Assim, conclui-se que a inserção de OmpF em lipossomas pré-preparados, pela técnica de cromatografia de exclusão, induz uma desorganização estrutural na membrana, sobretudo na zona da interface aquosa.

Comparando os resultados obtidos para esta técnica com resultados obtidos para estudos de anisotropia de fluorescência de proteolipossomas preparados pela técnica de adsorção hidrofóbica do detergente em Bio-Beads[®]^[45] os resultados são em tudo semelhantes excepto para a sonda DPH pois as diferenças na anisotropia, dos

lipossomas para os proteolipossomas, são mais acentuadas do que as verificadas neste estudo.

Deste modo, quando comparadas as metodologias, os resultados obtidos sugerem uma inserção de OmpF diferente, embora a inserção leve a uma desorganização estrutural típica para proteína integrais. O que se deduz é que a inserção da proteína a nível da interface aquosa, com base no comportamento verificado para a sonda TMA-DPH provoca o mesmo tipo de alterações na fase fluida para as duas metodologias, enquanto que na zona membranar propriamente dita, zona das cadeias hidrocarbonadas, o aumento dos valores de anisotropia sugere que parte da ordenação estrutural provém desta zona mas, no entanto, os valores obtidos para esta metodologia não permitem determinar, com exactidão, como se acomodará a proteína a nível membranar.

3. Interação da Enrofloxacina com OmpF

O progresso das quinolonas a nível do alargamento do seu espectro de acção antibacteriana tem vindo a sofrer altos e baixos desde a descoberta do Ácido Nalidíxico aproximadamente há 40 anos atrás devido ao desenvolvimento de resistências antibacterianas de alguns dos elementos das diferentes gerações de quinolonas. [1]

As bactérias podem tornar-se resistentes, à acção terapêutica das quinolonas, por mutações genéticas das moléculas alvo, isto é, onde as quinolonas vão actuar (enzima Topoisomerase IV e DNA girase) influenciando, de certo modo, a expressão bacteriana de porinas, neste caso específico, na expressão da porina OmpF. [1]

Uma vez que a Enrofloxacina é uma fluoroquinolona de uso veterinário, é necessário focar o estudo das interações deste antibiótico sob o ponto de vista da resistência bacteriana nos animais e das consequências que o uso excessivo deste fármaco em veterinária terá na saúde humana.

As bactérias que evidenciam resistência antimicrobiana têm vindo a ameaçar a saúde humana e animal, desde que se identificaram mecanismos de resistência bacteriana para quase todos os antibióticos utilizados em medicina e medicina veterinária. Embora a saúde e produção animal tenha melhorado, significativamente, com a introdução destes agentes, a existência de bactérias resistentes não só se torna um risco em termos de saúde animal mas também podem afectar a saúde pública, quando transmitidas aos humanos através de alimentos ou água. *Escherichia coli* – uma bactéria Gram (-), *Salmonella*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* ou *Campylobacter* são algumas das bactérias que têm vindo a adquirir resistência a vários antibióticos, sendo as quinolonas/fluoroquinolonas dos principais grupos terapêuticos aos quais estas bactérias se tornaram resistentes. [25]

OmpF é uma porina que se encontra presente, como já foi várias vezes referido, na membrana externa de bactérias Gram (-). A sua importância no transporte de quinolonas em *E.coli* foi comprovada por estudos efectuados com mutantes desta bactéria. No entanto, consoante a quinolona administrada, a permeação pode ocorrer por várias vias (pelo canal hidrofílico de OmpF, pela difusão através da interface lípido/proteína ou mesmo somente através da bicamada lipídica) mas este mecanismo ainda necessita de esclarecimento. [17]

De acordo com o panorama real da resistência bacteriana é, portanto, essencial entender a interação, a nível qualitativo de OmpF com Enrofloxacina, por ser um

antibiótico frequentemente utilizado em medicina veterinária e por isso poder ser um risco a nível de segurança alimentar.

3.1. Extinção de Fluorescência de OmpF, em proteolipossomas, pelo ião Iodeto

A extinção de fluorescência é um método importante no estudo de interações de substâncias com proteínas por ser uma técnica sensível, de fácil aplicação e utilização. [47]

Como já foi referido, a intensidade de fluorescência de um composto pode ser extinta por uma vasta variedade de interações moleculares, sendo uma dessas interações a extinção de fluorescência colisional (ou dinâmica).

OmpF adopta a estrutura de um trímero quando inserida numa membrana. Possui dois resíduos de triptofano (Trp) por monómero, o Trp⁶¹ na interface entre os trímeros e Trp²¹⁴ na interface lípido/proteína. [46, 47] O tipo de ambiente em que estes resíduos de triptofano se inserem, de acordo com os espectros de emissão de fluorescência de OmpF, ocorre para comprimentos de onda baixos, o que sugere uma localização dos Trp em ambientes hidrofóbicos. Estudos com mutantes de OmpF evidenciam um comprimento de onda de emissão mais baixo para mutantes de Trp⁶¹ e, uma vez que os comprimentos de onda de emissão de Trp geralmente decrescem quanto menor for a polaridade ambiental, este comportamento é sugestivo de uma maior hidrofobicidade do ambiente onde se encontra Trp⁶¹, isto é, na interface entre os monómeros. [46]

Agentes de extinção de fluorescência como o iodeto, oxigénio ou a acrilamida possuem a capacidade de extinguir a fluorescência de Trp. Uma vez que tanto o tamanho como a carga destes agentes é diferente, a observação da extinção da fluorescência da proteína permite distinguir a localização destes resíduos assim como observar alterações conformacionais da proteína. A intensidade de emissão de um Trp localizado à superfície será fortemente extinguida na presença de um agente possuidor de carga e hidrossolúvel (como o ião iodeto, por exemplo), enquanto que um Trp mais embrenhado na membrana não será tão afectado na sua emissão de fluorescência. [46]

Embora OmpF tenha 29 resíduos de tirosina (Tyr) quando excitada a 290nm a fluorescência dos Trp é excitada directamente enquanto que se forem utilizados

comprimentos de onda menores, é possível excitação dos resíduos de Tyr por transferência de energia. [46]

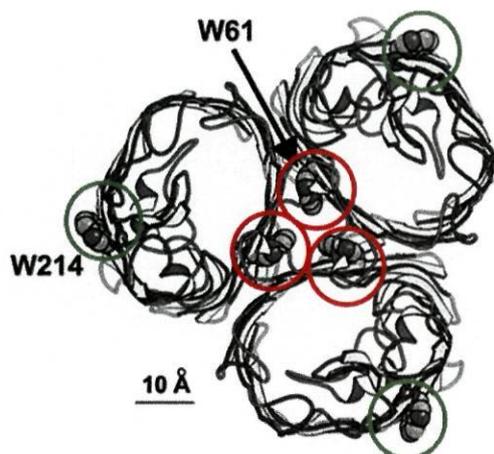


Figura 27 – Orientação estrutural de um trímero de OmpF e posicionamento dos resíduos de triptofano em cada monómero – vista de topo ○ (Trp²¹⁴) e ○ (Trp⁶¹). [46]

Os estudos realizados com OmpF inserida em lipossomas pré-preparados tiveram como objectivo a verificação da orientação da proteína dentro do lipossoma. Como os resultados obtidos anteriormente não permitem esclarecer o modo como OmpF se encontra inserida nos lipossomas, estudos de extinção de fluorescência com o ião iodeto podem confirmar os resultados já discutidos ou fornecer novas informações que permitam saber como se insere OmpF, em lipossomas, por cromatografia de exclusão.

A adição sucessiva de KI em concentração crescente influencia as propriedades espectroscópicas de OmpF, como se observa na figura 28. A intensidade de fluorescência observada para a proteína diminui à medida que a concentração de ião iodeto presente em solução aumenta.

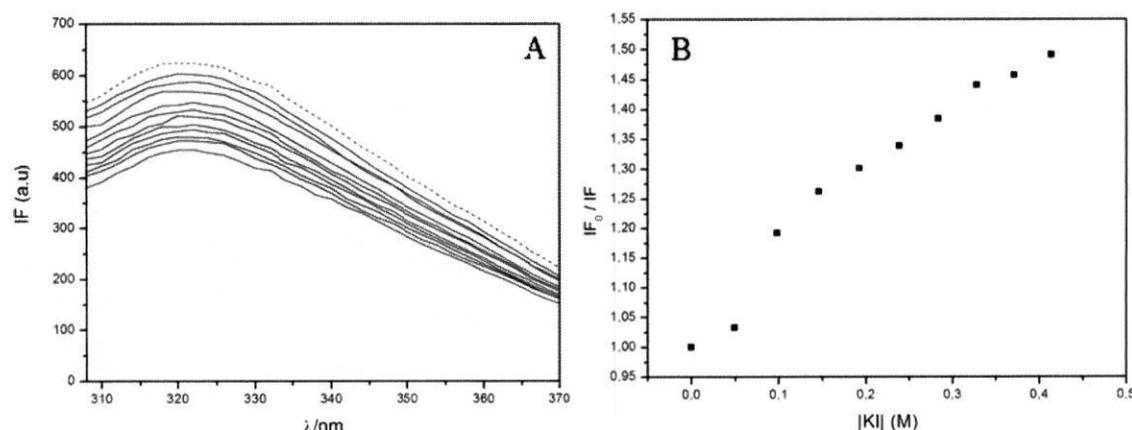


Figura 28 – (A) Espectro de emissão de fluorescência de OmpF inserida em lipossomas de DMPC na ausência (---) e presença (—) de concentrações crescentes de KI. Comprimento de onda de excitação de 290nm e (B) Representação gráfica da equação de Stern-Volmer (2.8) para a extinção de fluorescência de OmpF em lipossomas de DMPC em função da concentração de KI.

Os resultados foram analisados de acordo com a equação de Stern-Volmer para extinção de fluorescência dinâmica. Se OmpF possuísse, unicamente, um resíduo de triptofano, a relação com a concentração de agente de extinção era de se esperar linear, o que poderia não acontecer para os resultados obtidos, uma vez que OmpF possui dois resíduos de triptofano em posições e ambientes diferentes.^[67]

Como se pode observar, a representação gráfica de $\frac{IF_0}{IF}$ vs $[KI]$ origina, em vez de uma recta, uma ligeira curvatura pelo que é necessário ajustar a equação aos resultados, utilizando para este caso a equação de Stern-Volmer modificada por Lehrer (2.8), uma vez que os Trp são de diferente acessibilidade.^[64]

Os resultados da tabela revelam as alterações à constante de Stern-Volmer por extinção da fluorescência de OmpF e Trp em diferentes meios de reconstituição. Para o Trp o valor obtido provém de uma relação linear (aplicação directa da equação de Stern-Volmer), enquanto que os restantes valores das constantes foram obtidos por aplicação da equação de Stern-Volmer modificada e que permite a obtenção de uma recta de onde se retiram os valores da constante e fracção acessível de fluoróforo.

	Iodeto	
	Ka (M ⁻¹)	f _a
Trp micelas mistas DMPC ^[45]	8,0 ± 0,1	1,0
OmpF micelas mistas DMPC ^[45]	2,8 ± 0,2	0,4 ± 0,1
OmpF/proteolipossomas ^{(a) [45]}	6,4 ± 0,4	0,3 ± 0,1
OmpF/proteolipossomas ^(b)	5,3 ± 0,1	0,5 ± 0,1

(a) BioBeads[®] (b) Cromatografia de exclusão

Tabela 8 – Valores das constantes de Stern-Volmer modificadas e respectiva fracção acessível para a extinção de fluorescência de Trp e OmpF em diferentes meios.

Uma vez que OmpF é uma proteína com dois resíduos de Trp é de esperar que a extinção de fluorescência seja afectada pela diferente acessibilidade dos dois triptofanos. A fracção acessível obtida sugere que o agente de extinção tem, apenas, acesso a um dos triptofanos uma vez que $f_a + f_b = 1$ (sendo f_a a fracção acessível e f_b , a fracção inacessível, num ambiente mais hidrofóbico). Estando o Trp²¹⁴ localizado na interface lípido/proteína, e portanto num ambiente ligeiramente hidrofílico a sua fluorescência é facilmente extinguida pelo ião iodeto pelo que o grosso da fluorescência

de OmpF virá do Trp⁶¹ uma vez que se encontra num ambiente mais hidrofóbico e por isso de mais difícil acesso.

O valor obtido para os proteolipossomas de OmpF por cromatografia de exclusão apresenta-se em tudo muito semelhante ao obtido para OmpF em proteolipossomas pela reconstituição com recurso à adsorção hidrofóbica de detergente (Bio-Beads®). Os resultados obtidos, aliados à distribuição de tamanhos para a reconstituição por cromatografia de exclusão, levam a supor que ambas as reconstituições membranares produzirão lipossomas com inserções proteicas semelhantes.

Por análise dos valores tabelados conclui-se ainda que a acessibilidade da fluorescência dos Trp para ser extinguida pelo ião iodeto diminui à medida que estes se vão encontrando em meios mais organizados. A extinção de fluorescência observada para a mistura micelar OmpF/oPOE/DMPC (micelas mistas) é bastante menor do que a observada para OmpF em proteolipossomas (obtidos por ambas as metodologias de reconstituição). Uma explicação para tal facto pode residir no tipo de organização estrutural que a proteína adoptará na presença das diferentes características químicas e estruturais dos dois meios mencionados. Como já foi referido, na reconstituição de uma proteína é necessário assegurar a actividade da mesma, entre outras condições. Isto só é possível quando OmpF se encontra inserida em lipossomas, não só pela sua acomodação na bicamada lipídica mas também pela presença do compartimento aquoso que permite uma melhor acomodação das extremidades hidrofílicas da proteína e da sua organização como canal iónico, o que poderá justificar a maior eficiência dos agentes de extinção com os Trp a que têm acesso. [45]

No entanto um complemento a este estudo seria, sem dúvida, uma análise do comportamento da extinção de fluorescência de OmpF por um agente de extinção que actuasse a nível da proteína, como por exemplo a acrilamida. [66]

3.2. Extinção de Fluorescência de OmpF, em proteolipossomas, pelo ião Iodeto na presença da Enrofloxacina

A extinção de fluorescência de OmpF pelo ião iodeto, na presença de uma concentração fixa de Enrofloxacina permite avaliar a extensão da permeação do antibiótico na porina.

A adição de fármaco à proteína provoca um ligeiro deslocamento do comprimento de onda máximo de emissão ($\text{OmpF}_{\text{reconst}}=322\text{nm}$; $\text{OmpF}_{\text{reconst}}+\text{ENR}=324\text{nm}$) o que já evidencia uma certa interacção do antibiótico com a porina. Após adições sucessivas de KI, a intensidade de fluorescência de OmpF vai diminuindo, gradualmente, o que implica que um dos Trp está a interactuar com o agente de extinção. Estas alterações espectroscópicas são observáveis no espectro de UV-Vis e espectro de emissão de fluorescência representados na figura 29.

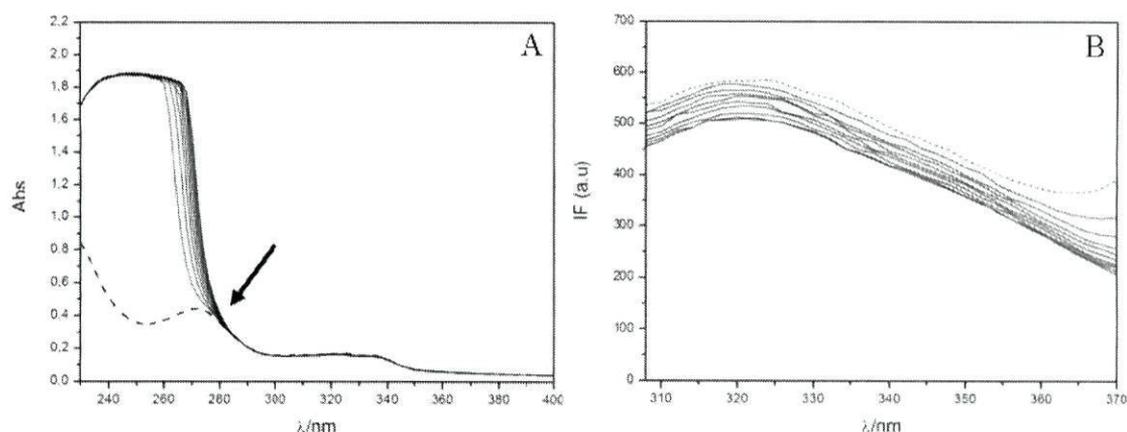


Figura 29 – (A) Espectro de UV-Vis e (B) Espectro de emissão de fluorescência de OmpF inserida em lipossomas de DMPC (na presença de Enrofloxacin) na ausência (---) e presença (—) de concentrações crescentes de KI. Comprimento de onda de excitação de 290nm.

Como é possível observar, pelo espectro de UV-Vis, não é necessário efectuar qualquer correcção à intensidade de fluorescência observada e a constante de Stern-Volmer é calculada a partir da aplicação directa da equação aos valores experimentais e

representada graficamente por $\frac{IF_0}{IF} - 1 \text{ vs } [KI]$

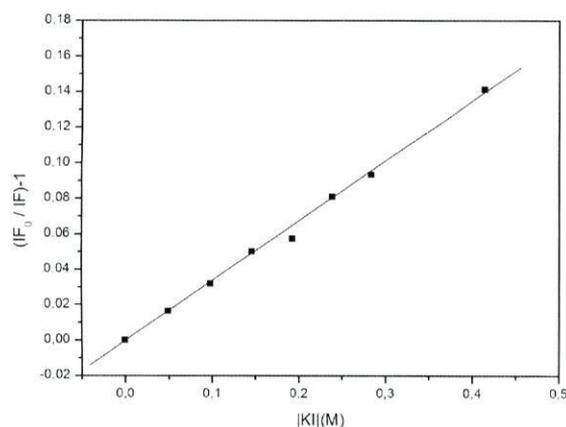


Figura 30 – Representação gráfica da equação de Stern-Volmer para a extinção de fluorescência de OmpF em lipossomas de DMPC, em função da concentração de KI.

A aplicação directa da equação de Stern-Volmer (2.0), como se verifica, dá origem a uma recta cujo declive é igual a $0,32 \pm 0,08$. Deste modo, a fracção acessível de Trp será 1,0 o que leva a deduzir que o Trp²¹⁴, que se encontra num ambiente mais hidrofílico, terá a sua fluorescência extinta pelo ião iodeto enquanto que a fluorescência do Trp⁶¹, mais hidrofóbico, será influenciada pela presença da Enrofloxacina.

Como a constante de Stern-Volmer é pequena, supõe-se que existirá uma permeação da enrofloxacina, na interface lípido/proteína ou para o interior do canal pois, de outro modo, a fluorescência da OmpF seria extinta pelo ião iodeto e a constante de Stern-Volmer obtida seria semelhante à determinada para a porina na ausência de fármaco e presença de ião iodeto.

Comparando em termos gerais, com a Ciprofloxacina, os valores obtidos são mais baixos mas é importante frisar, novamente, que as estruturas em estudo diferem das utilizadas nos estudos realizados para a Ciprofloxacina pelo que esta é uma comparação bastante rudimentar e estudos posteriores, como por exemplo, estudos de alteração à condutividade eléctrica de OmpF poderão fornecer dados mais precisos, uma vez que nestes casos a estrutura membranar utilizada é igual.

3.3. Extinção de Fluorescência de OmpF, em proteolipossomas, em presença da Enrofloxacina

OmpF é uma porina que permite a difusão de moléculas hidrofílicas (de tamanho inferior a 600 Da), influenciada pelas propriedades físico-químicas dos solutos tais como o tamanho, carga ou lipofilicidade e, embora não evidencie uma selectividade específica, exhibe alguma selectividade iónica. [33, 35]

O estudo da associação/ligação de fármacos a proteínas é de extrema importância, não só para entender a extensão e o mecanismo de interacção dos fármacos com a porina mas também para perceber a função “específica” destes canais. [47]

A associação entre um composto e uma proteína passa, impreterivelmente, pelo modo de interacção entre ambos. Estas interacções podem ser a nível estrutural, por adaptação do fármaco à estrutura proteica ou a nível físico-químico, onde o fármaco e a proteína interactuam a nível molecular. [45]

Como já foi referido, a fluorescência intrínseca de uma proteína deve-se à presença de resíduos de triptofano nas cadeias de aminoácidos que constituem a proteína e, uma vez que a fluorescência dos resíduos de triptofano é muito sensível a

alterações do ambiente em que se encontra (sobretudo a nível da polaridade do mesmo) qualquer interação de um ligando com o local onde se encontra o Trp pode influenciar a emissão de fluorescência de OmpF.

A determinação de constantes de associação (K_{ass}) entre OmpF e a Enrofloxacin foi realizada a partir das variações espectroscópicas observadas para a proteína. Neste caso, a constante de associação, permite uma avaliação da afinidade da fluoroquinolona para o canal porínico o que torna possível a determinação do nível de permeação deste antibiótico em bactérias Gram (-).

As alterações espectroscópicas observadas pela adição sucessiva de ENR encontram-se representadas na figura 31.

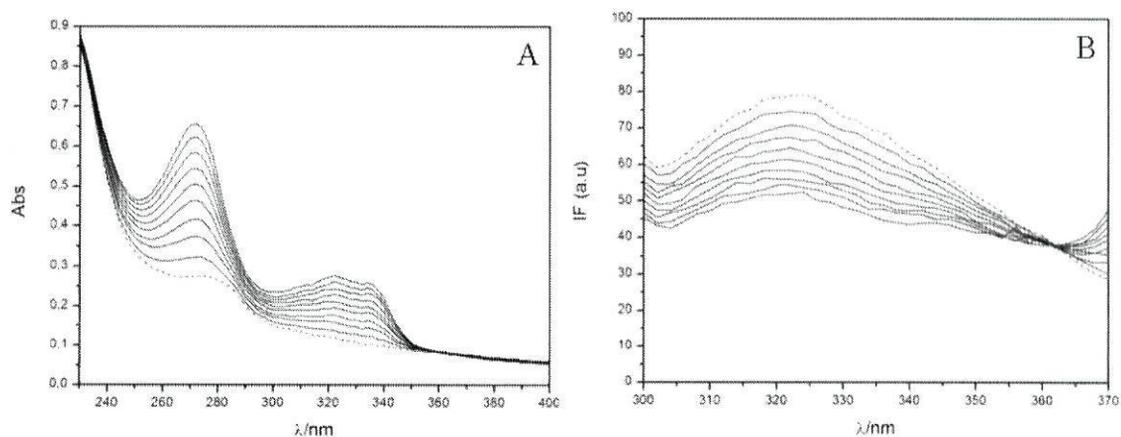


Figura 31 – (A) Espectro de UV-Vis e (B) Espectro de emissão de OmpF inserida em proteolipossomas de DMPC na ausência (---) e presença (—) de concentrações crescentes de Enrofloxacin (0 a 18,8 μ M). $\lambda_{\text{exc}} = 290\text{nm}$.

A intensidade de fluorescência de OmpF sofreu um decréscimo à medida que a concentração de Enrofloxacin aumentou e também sofreu um ligeiro deslocamento ao comprimento de onda máximo de emissão, como se pode observar na figura 31.

Embora exista um deslocamento do comprimento de onda máximo de OmpF, para valores inferiores, após a primeira adição de Enrofloxacin, este deslocamento é muito pequeno (2nm) o que não introduz grandes alterações aos resultados obtidos. No entanto, este pequeno deslocamento pode ser indicativo de uma localização mais hidrofóbica (menos exposto ao solvente) do Trp, cuja fluorescência foi extinguida. ^[86]

Por observação do espectro de UV-Vis, na figura 31, é notória a influência da Enrofloxacin em OmpF à medida que a concentração de fármaco aumenta pois, este absorve ao comprimento de onda de excitação (290nm). Deste modo, é necessário

efectuar correcções à intensidade de fluorescência observada através das equações (3.0) e (3.6) de modo a eliminar a contribuição da Enrofloxacina no espectro de fluorescência de OmpF na presença do fármaco.

Os resultados experimentais foram ajustados de acordo com a equação (3.7) e representados graficamente por $IF_0 - IF$ vs $|Enrofloxacina|$. Na figura 32, encontram-se representados os ajustes não linear e linear aos valores experimentais.

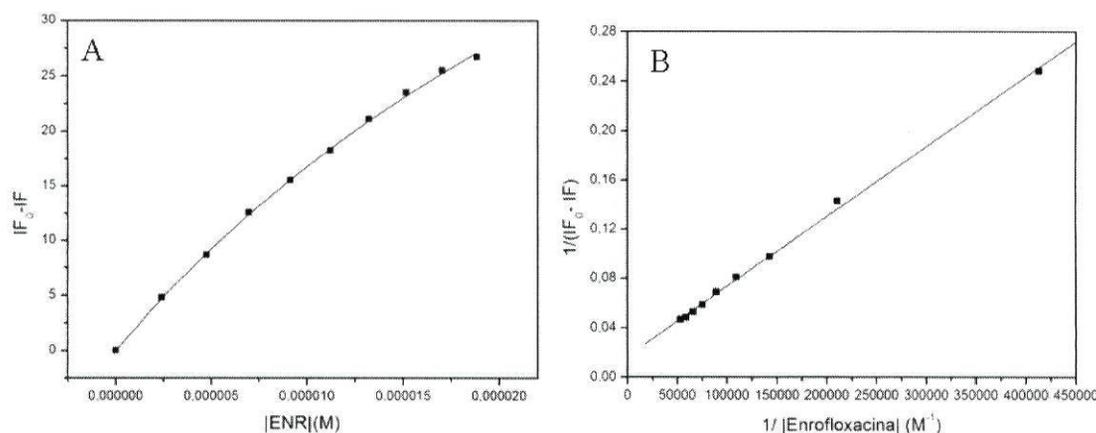


Figura 32 – (A) Ajuste não linear à equação (Kp) e (B) ajuste linear eq y da variação da fluorescência de OmpF por adição de concentrações crescentes de Enrofloxacina (0-18,8 μ M). O comprimento de onda de excitação utilizado foi 290nm e a análise realizada a 322nm.

A tabela 9 permite-nos estabelecer um nível de comparação entre a afinidade para a proteína por parte da Enrofloxacina e a Ciprofloxacina, uma vez que os estudos efectuados com a última se referem à presença de OmpF em proteolipossomas.

	Enrofloxacina	Ciprofloxacina
	log K_{ass}	log K_{ass}
OmpF/proteolipossomas	4,40 \pm 0,04	3,58 \pm 0,07 ^(*)

Tabela 9 – Valores obtidos para a constante de associação Enrofloxacina/OmpF e Ciprofloxacina/OmpF através do ajuste não linear (3.7) aos dados experimentais.

(*) Valores obtidos experimentalmente para estudos de RET. [45]

Como se observa, os valores obtidos para as constantes de associação, são superiores para a Enrofloxacina quando comparados com a Ciprofloxacina, uma fluoroquinolona sua análoga e da mesma geração, o que evidencia uma maior afinidade do antibiótico em estudo para o canal hidrofílico.

Com base nos estudos efectuados com lipossomas, onde se verifica uma certa partição do fármaco na bicamada lipídica, e nos estudos de associação é possível especular sobre o mecanismo de interacção das quinolonas onde, provavelmente, a partição pela bicamada lipídica, por difusão, é o primeiro passo para a interacção com o canal porínico. Ao inserir, no lipossoma, o canal porínico e pondo-o em contacto com o fármaco este vai particionar-se pela bicamada lipídica e a proximidade com a proteína vai promover, possivelmente, a interacção entre os dois.

3.4. Conclusões

Com base nos resultados apresentados é possível observar um certo nível de interacção entre a enrofloxacina e a proteína OmpF. Os estudos de extinção de fluorescência de OmpF em proteolipossomas, pelo ião iodeto, na presença de antibiótico, permitem identificar a zona de interacção, isto é, se esta ocorre perto da interface lípido/proteína (zona do Trp²¹⁴) ou se por outro lado ocorre no interior do canal hidrofílico (zona do Trp⁶¹). Os resultados obtidos apontam para uma fracção acessível de 1,0, ou seja, para uma acessibilidade total de um dos triptofanos por parte do ião iodeto. Sendo este ião um ião hidrossolúvel, deduz-se que a sua acção será apenas verificada no Trp mais hidrofílico, isto é o Trp²¹⁴. Com base nestes resultados é possível, ainda, concluir que, se o ião iodeto extingue a fluorescência do Trp²¹⁴ e, uma vez que o valor para a constante de Stern-Volmer se mostra muito pequeno, supõe-se que a enrofloxacina estará ligada, mais fortemente, a OmpF, o que influenciará a fluorescência do Trp⁶¹, que se encontra num ambiente mais hidrofóbico, sugerindo uma maior afinidade da enrofloxacina para a porina.

A interacção de OmpF com a fluoroquinolona enrofloxacina pode, também, ser traduzida pelo valor da sua constante de associação, que revela uma afinidade deste antibiótico por OmpF equivalente à das fluoroquinolonas de gerações mais recentes (3ª geração). As últimas gerações de quinolonas possuem um espectro de acção mais abrangente e deste modo, é possível especular sobre a facilidade de acesso do fármaco, ao compartimento intracelular da célula bacteriana, pela difusão através de OmpF.

3.5. Alterações à condutividade iónica de OmpF

OmpF é uma proteína (porina) que se encontra na membrana externa das bactérias Gram (-) e tem como função permitir a difusão de iões e moléculas de pequena massa molecular, portanto funciona como barreira à entrada de solutos dentro da proteína.

As barreiras de permeação membranar são um dos factores que mais contribui para a resistência intrínseca das bactérias aos antibióticos e os mecanismos de acção pelos quais os fármacos actuam ainda são parcialmente desconhecidos, embora se saiba que um dos passos essenciais é a translocação através da membrana do organismo alvo.

Os estudos de partição e localização membranar da fluoroquinolona de 2ª geração Enrofloxacin apontam para uma distribuição membranar mais superficial o que não está de acordo com uma difusão exclusivamente membranar. Simultaneamente, os estudos de extinção de fluorescência em proteolipossomas com o ião iodeto, na presença da enrofloxacin, apontam para uma possível interacção da fluoroquinolona ao nível do canal hidrofílico de OmpF. Por fim, a quantificação, através da determinação de constantes de associação, permitiu estabelecer o nível de afinidade desta fluoroquinolona para o interior de OmpF.

Uma técnica que permite determinar se existe difusão de moléculas pelo interior do poro ou se existe mesmo uma ligação de um substrato ao interior do canal porínico é a medição da condutividade iónica do canal em função do tempo. Os iões têm dimensões, em tamanho, semelhantes à porina e os iões atravessam-na através da aplicação de campo eléctrico externo. Assim, qualquer perturbação ou obstáculo será observada, pois influenciará o comportamento da corrente iónica. Estas flutuações fornecem informações sobre o que se passa dentro do poro (difusão ou ligação ao poro).
[71]

3.5.1. Alterações à intensidade de corrente de OmpF ao longo do tempo

Uma primeira abordagem da interacção da fluoroquinolona Enrofloxacin com OmpF, consistiu na observação das variações à corrente iónica da proteína provocadas pela adição de concentrações crescentes de antibiótico.

A voltagem aplicada foi de $\pm 50\text{mV}$ visto a concentração de sal (KCl) utilizada ser relativamente baixa para esta técnica (150mM) e, porque ao aplicar voltagens elevadas, o trímico tem tendência para fechar (“gating”). Assim, quando se encontra

inserido um único trímero de OmpF, para 150mM KCl e voltagem aplicada de $\pm 50\text{mV}$ e na ausência de antibiótico, a condutância da porina é de aproximadamente, 0,9nS (figura 33) e assim, é possível verificar se as variações de condutância se devem à presença ou não de um substrato dentro da porina. A aplicação de uma voltagem permite o fluxo de iões através do canal porínico de acordo com o potencial dos eléctrodos, assim como da voltagem aplicada.

Como a porina OmpF possui uma inserção ordenada e assimétrica, foi necessário verificar se a extremidade à qual se adiciona o antibiótico (*cis* ou *trans*) influencia a interacção observada, portanto foram feitas adições ao mesmo lado da adição de OmpF (*cis*), ao lado oposto (*trans*) e em ambos os lados. Genericamente, designa-se o lado *cis* como o lado do sistema onde se adiciona a proteína e *trans* o lado oposto à adição de proteína. [87]

Os resultados apresentados referem-se somente a medições ao lado *cis*, uma vez que este lado representa o lado extracelular, portanto o lado onde biologicamente o antibiótico será adicionado.

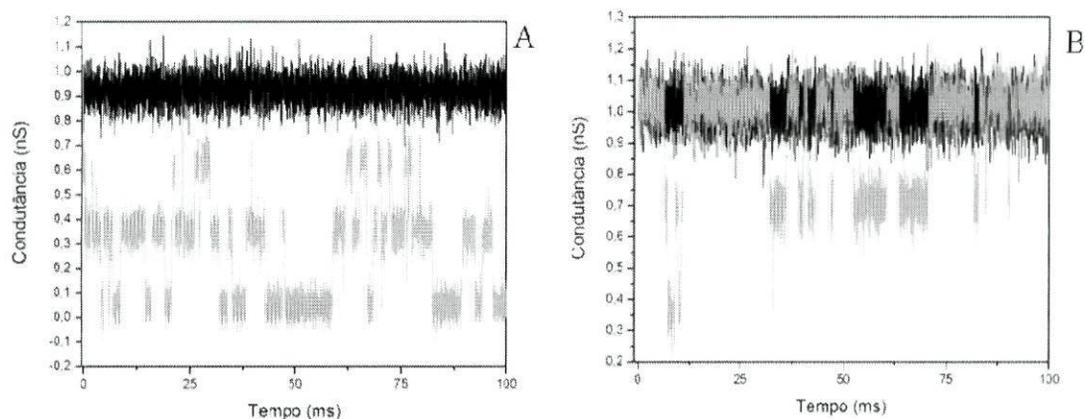


Figura 33 – Condutância iónica através de OmpF (A) – 50mV e (B) + 50mV, na ausência (—) e presença de 3,5mM de ENR (---) (escala ampliada).

A figura 33 representa a corrente iónica de um trímero de OmpF em função do tempo (para -50/+50mV) e, como se pode observar, existem interrupções à corrente iónica da proteína quando lhe é adicionada o fármaco. Os espectros apresentam-se com ampliação de escala o que nos permite observar, com maior facilidade, as interrupções à corrente iónica verificadas. Também é possível verificar que o bloqueio do canal porínico é bastante mais significativo quando aplicados -50mV.

3.5.2. Densidade Espectral

Para uma maior conveniência do tratamento de dados, as flutuações de corrente iónica em função do tempo (domínio temporal) podem ser transformadas num domínio de frequência através da transformada de Fourier. A adição de antibiótico, e ligação deste ao interior da porina, como se pode observar (fig. 34), provoca um aumento do ruído espectral, que pode ser descrito através de uma curva lorentziana e a partir da qual se podem determinar as constantes cinéticas de ligação. [72]

Se a presença de flutuações reflecte a permeação da enrofloxacinina pelo canal porínico a determinação de constantes cinéticas torna-se um factor fundamental na dedução dos parâmetros termodinâmicos e cinéticos da translocação de antibióticos. A análise da densidade espectral (fig.34) constitui um dos métodos possíveis para a análise estatística das flutuações induzidas pela presença de fármaco. [88]

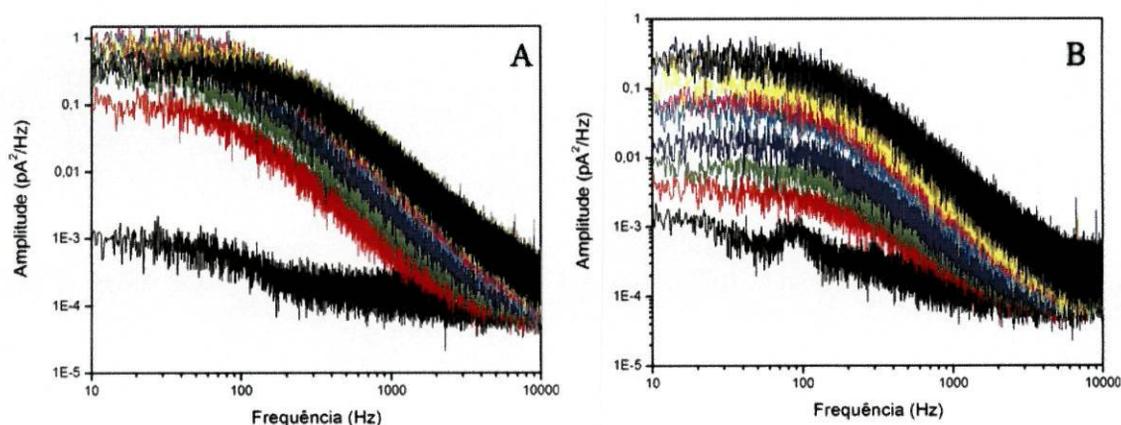


Figura 34 – Espectro de densidade espectral (A) – 50mV e (B) + 50mV, na ausência (—) e presença de concentrações crescentes de Enrofloxacinina: (—) 250µM; (—) 400µM; (—) 500µM; (—) 1,0mM; (—) 2,0mM; () 2,5mM; (—) 3,0mM; (—) 3,5mM.

Na figura 34-A é bastante claro que a adição de enrofloxacinina, mesmo em pequenas concentrações, provoca alterações espectrais bastante significativas. Uma vez que OmpF possui um sinal com uma ordem de grandeza 2 vezes inferior aos sinais obtidos para as diferentes concentrações de antibiótico, não é necessário proceder à subtração do sinal obtido para a proteína e, deste modo, o ajuste de uma função Lorentziana (3.8) é efectuado aos sinais em que se encontra presente a enrofloxacinina.

A figura 35-A representa o ajuste da função lorentziana, para o sinal que corresponde à maior concentração de antibiótico (3,5mM).

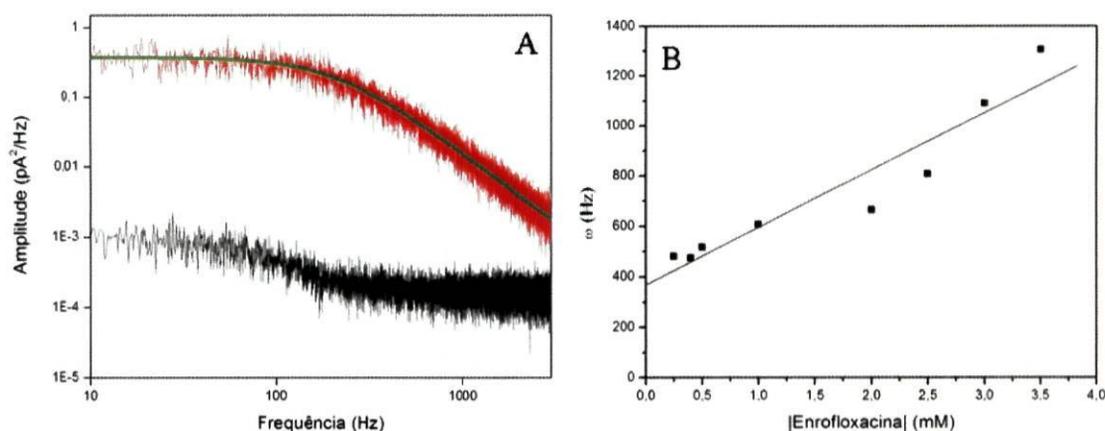


Figura 35 – (A) Ajuste lorentziano aos resultados obtidos para concentrações de enrofloxacina de 3,5mM. (B) Frequência angular obtida a partir do ajuste aos espectros de densidade espectral para as diferentes concentrações de antibiótico.

O ajuste dos resultados à função lorentziana, permite obter o valor da frequência angular (f_c , representada na figura 35-B como ω) e a partir desta é possível determinar o tempo de relaxamento, que corresponde ao tempo médio de transporte através do poro. De acordo com a equação (3.9) é possível representar graficamente, uma relação entre a frequência angular e a concentração de enrofloxacina adicionada (figura 35-B), para adições ao lado *cis*. A partir de um ajuste linear à representação gráfica dos resultados obtidos é possível obter os valores das constantes cinéticas de associação/dissociação ($k_{\text{associação}}=2,28 \times 10^5 \pm 3,10 \times 10^4 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ e $k_{\text{dissociação}}=369 \pm 63 \text{ s}^{-1}$). Estas constantes permitem calcular a constante de ligação, a partir de $K = \frac{k_{\text{associação}}}{k_{\text{dissociação}}}$, que é uma expressão da afinidade do antibiótico pelo canal porínico, cujo valor é $617 \pm 90 \text{ M}^{-1}$.

Comparando com os valores obtidos para outras quinolonas pode-se considerar que este antibiótico possui uma afinidade para OmpF superior a quinolonas de gerações superiores, como a moxifloxacina ($K=8 \text{ M}^{-1}$). O tempo de residência (tempo médio que o antibiótico permanece no canal) para a enrofloxacina é determinado a partir do número de bloqueios do canal (*blocking events*) que corresponde ao número de vezes que uma molécula de ENR se encontra a bloquear o canal porínico por segundo e também pelo comprimento do bloqueio. O número de *blocking events* é determinado através do software utilizado para o tratamento de dados. O tempo de residência depende da concentração de antibiótico e para 3,5mM é de aproximadamente 2,3ms o que é bastante superior aos conhecidos para outros antibióticos, por exemplo, Moxifloxacina=50 μs , Ampicilina=120 μs . Como são muito longos para este fármaco, a

possibilidade de serem devidos a difusão pelo canal é quase nula e portanto, estes bloqueios podem ser significativos de uma ligação do antibiótico ao interior da porina em mais que um poro, simultaneamente.

3.5.3. Conclusões

Os estudos de condutividade eléctrica de OmpF surgem como um complemento para a compreensão das vias de permeação membranar da quinolonas. Os estudos de extinção de fluorescência de OmpF por parte da enrofloxacina (fluoroquinolona de 2ª geração) realizados com proteolipossomas evidenciaram que esta quinolona possui uma certa afinidade para o canal proteico uma vez que a sua constante de associação é mais elevada do que a que se encontra associada para as restantes quinolonas de 2ª geração.

Os estudos de condutividade eléctrica constituem, assim, um método mais directo para a localização do antibiótico no interior de cada um dos monómeros que formam OmpF.

As flutuações da corrente iónica de OmpF provocadas pela presença de ENR fazem-se sentir mais intensamente à medida que a concentração de antibiótico dentro do canal vai aumentando, provocando bloqueios prolongados do canal porínico superiores aos conhecidos para quinolonas de 4ª geração.

Este tipo de metodologia permite, não só, verificar as diferentes vias de permeação membranar de OmpF mas também a existência de uma ligação, efectiva, entre o interior do canal hidrofílico e a enrofloxacina. Assim, o conhecimento das propriedades físico-químicas e estruturais do antibiótico, assim como a sua associação a este canal proteico tornam-se informações pertinentes no desenvolvimento de novos antibióticos para combate às resistências bacterianas conhecidas e prevenção do desenvolvimento de novas resistências.

Capítulo IV: Considerações Finais

Capítulo IV: Considerações Finais

Com este capítulo pretende-se proceder a uma síntese das conclusões retiradas uma vez que a sua discussão já foi realizada no capítulo anterior, onde sempre que possível, foram estabelecidas comparações entre os resultados obtidos e resultados descritos na literatura ou a partir de outras metodologias.

A permeação membranar das quinolonas é referida, geralmente, como um passo essencial para a sua actividade antibacteriana. No entanto a importância do estudo a nível molecular da permeação membranar, como já foi referido nesta dissertação, deve-se sobretudo ao aumento da resistência bacteriana a diversas famílias de antibióticos. Deste modo, o principal objectivo deste trabalho consistiu na determinação da importância das diferentes vias de entrada da enrofloxacin na célula bacteriana. No entanto focou-se parte do estudo na importância da entrada pela via porínica uma vez que esta se encontra geralmente associada a um aumento da eficácia antibacteriana.

Para compreender e esclarecer todas as variáveis envolvidas na entrada de um antibiótico numa célula bacteriana é necessário a presença de um sistema mimético que reproduza a biomembrana relativamente à variável que se pretende avaliar. Existem vários modelos miméticos mas, neste trabalho foram utilizados três. Inicialmente realizaram-se estudos com lipossomas, que além de permitirem determinar a importância membranar da componente lipídica também permitem quantificar a permeação da enrofloxacin nas membranas, como por exemplo na ausência de células bacterianas, permitem saber se o fármaco tem tendência para se particionar para um meio lipídico. Posteriormente, os estudos com proteolipossomas e bicamada lipídica planar permitiram avaliar a interacção da enrofloxacin com componentes proteicas, mais especificamente com a porina OmpF. Na reconstituição da proteína em lipossomas foi utilizada uma metodologia de remoção de detergente de fácil execução, que resultasse numa inserção da proteína na sua conformação activa e numa orientação, de acordo com o sentido de permeação, correcta.

No estudo da interacção da enrofloxacin com lipossomas a determinação do seu coeficiente de partição deve ser o primeiro passo, pois não só é essencial para a compreensão da extensão da interacção mas também para a do mecanismo de permeação da fluoroquinolona através de membranas. No entanto, o valor do coeficiente de partição não permite especular ou determinar a localização do antibiótico dentro da bicamada lipídica, isto é, se a sua permeação é na interface lípido/solução

aquosa ou se a sua permeação é mais extensa e este se encontra localizado mais profundamente na zona hidrocarbonada.

A determinação dos coeficientes de partição da enrofloxacinina entre uma fase aquosa (Hepes) e uma fase lipídica (DMPC e DMPG) revelou valores superiores aos estabelecidos para a Ciprofloxacina (fluoroquinolona de 2ª geração sua análoga) e valores semelhantes aos obtidos para fluoroquinolonas de gerações superiores (Grepafloxacinina ou Moxifloxacinina) o que se deverá às alterações a nível estrutural (maior hidrofobicidade) e propriedades ácido-base. No que diz respeito aos coeficientes de partição entre os lípidos de diferente composição, o coeficiente de partição obtido para DMPG é cerca de duas vezes superior ao obtido para DMPC o que sugere uma maior interacção do antibiótico com vesículas carregadas negativamente, isto é, uma interacção electrostática entre o fármaco e o lípido. Geralmente as quinolonas interagem ao nível da interface bicamada/água (zona polar dos fosfolípidos) pelo que se supõe que também a enrofloxacinina interagirá a esse nível. A extinção de fluorescência da enrofloxacinina na presença de uma componente lipídica, permite localizar a zona de interacção entre ambos, e os resultados de localização membranar obtidos vêm confirmar a hipótese proposta com base nos coeficientes de partição, isto é, da existência de uma interacção electrostática.

A reconstituição da porina OmpF em lipossomas pré-preparados por cromatografia de exclusão foi seleccionada por ser uma técnica simples e de rápida execução no que diz respeito à remoção de detergente. A reconstituição por exclusão permite a fácil separação do material não encapsulado e do detergente presente na mistura com base no diferente tamanho das estruturas. Uma vez que a natureza do detergente pode influenciar o tamanho e a composição dos proteolipossomas obtidos, a caracterização por dispersão de luz permite obter o perfil das estruturas presentes nas fracções recolhidas e avaliar, deste modo, não só o diâmetro das vesículas de modo a poder realizar ensaios com uma população com cerca de 100nm de diâmetro mas também se existem vestígios de detergente que possam vir a influenciar ensaios futuros. Estes resultados, aliados aos ensaios de anisotropia de fluorescência permitem-nos verificar se as características dos proteolipossomas preparados estão de acordo com a influência de proteínas membranares nas propriedades físicas de membranas lipídicas e, assim, avaliar a inserção proteica.

Os estudos de interacção OmpF/Fluoroquinolona tiveram como objectivo a avaliação da afinidade da enrofloxacinina para a porina, a comparação desta afinidade

com a da ciprofloxacina e a determinação da zona onde o antibiótico actua, ou seja, se a interacção é ao nível do interior do canal porínico (por difusão ou ligação ao canal) ou da interface lípido/proteína.

A afinidade da fluoroquinolona para OmpF foi verificada a partir da determinação de constantes de associação OmpF/Enrofloxacina. Os resultados obtidos revelam uma afinidade equivalente à das fluoroquinolonas de 3ª geração. Como as gerações mais recentes possuem um espectro de acção mais abrangente é possível imaginar uma maior facilidade de acesso do fármaco, ao compartimento intracelular da célula bacteriana. A determinação da afinidade do fármaco para a proteína foi realizada, apenas, para o sistema OmpF/proteolipossomas. Tal, deve-se ao facto de OmpF ser uma proteína membranar e a inserção desta em lipossomas será o sistema que melhor caracteriza e mimetiza o seu ambiente natural.

A extinção de fluorescência de OmpF com diferentes agentes de extinção permite identificar a zona de interacção, isto é, se esta ocorre perto da interface lípido/proteína (zona do Trp²¹⁴) ou se por outro lado ocorre no interior do canal hidrofílico (zona do Trp⁶¹). A extinção da porina pelo ião iodeto, na presença da enrofloxacina sugere uma acessibilidade total a apenas um dos triptofanos, por parte do agente extintor. Devido à hidrofiliidade do ião iodeto deduz-se que a extinção de fluorescência verificada será a do isto é o Trp²¹⁴ (mais hidrofílico). Deste modo é possível concluir que a enrofloxacina estará ligada, mais fortemente à proteína, o que influenciará a fluorescência do Trp mais hidrofóbico (Trp⁶¹) sugerindo uma maior afinidade da fluoroquinolona para a porina.

Os estudos de condutividade iónica da porina OmpF fornecem informações sobre a interacção da enrofloxacina com o interior do canal hidrofílico, o que permite verificar qual a via de permeação membranar, isto é, se a permeação da fluoroquinolona se faz através da via porínica ou por via hidrofóbica. Os resultados obtidos evidenciam a existência de uma ligação efectiva entre o interior do canal hidrofílico e a enrofloxacina, ou seja, uma permeação essencialmente por via porínica uma vez que a presença de antibiótico provoca bloqueios prolongados do canal porínico.

O esclarecimento da via de permeação membranar da Enrofloxacina (utilizada em medicina veterinária) é importante, não só pelo esclarecimento do mecanismo de permeação e da sua influência no desenvolvimento de resistência bacteriana mas também por este fármaco ser frequentemente utilizado como promotor de crescimento ou mesmo administrado a animais saudáveis como medida preventiva. Assim, o

esclarecimento da extensão da sua permeação permite especular sobre a sua influência a nível da saúde humana, especialmente no sector alimentar como por exemplo: uma vez que a enrofloxacin possui uma certa afinidade para componentes lipídicas, como foi demonstrado pelos coeficientes de partição, se o fármaco for administrado a um animal saudável, este deixará de ter um alvo de acção específico (células bacterianas) podendo permear através de membranas celulares ou mesmo na gordura animal. Deste modo, o antibiótico tornar-se-á mais difícil de excretar, uma vez que a sua concentração na fase aquosa diminui por partição para uma fase lipídica.

Capítulo V: Bibliografía

Capítulo V: Bibliografia

1. Andriole, V. T. 2000. *The Quinolones*, 3rd edition, Elsevier Inc.
2. Appelbaum, P.C., Hunter, P.A. 2000, The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 16: 5-15.
3. P.G. Higgins, Fluit, A.C., Schmitz, F-J. Fluoroquinolones: Structure and target sites. *Current Drug Targets*, 2003, 4: 181-189.
4. Guimarães, S. 2001, *Terapêutica Medicamentosa e Suas Bases Farmacológicas*, Capítulo 60, 4^a edição, Porto Editora.
5. Van Bambeke, F., Michot, J-M., Van Eldere, J., Tulkens, P. M. 2005. Quinolones in 2005: an update. *Clinical Microbiology and Infection*, 11: 256-280.
6. Sárközy, G. 2001. Quinolones: a class of antimicrobial agents. *Veterinari Medicina*, 46 (9-10): 257-274.
7. De Souza, M.V.N. 2005. New fluoroquinolones: A class of potent antibiotics. *Mini-reviews in Medicinal Chemistry*, 5: 1019-1017.
8. Drakopoulos, A.I., Ioannou, P.C. 1997. Spectrofluorimetric study of the acid-base equilibria and complexation behaviour of the fluoroquinolones antibiotics ofloxacin, norfloxacin, ciprofloxacin, and pefloxacin in aqueous solution. *Analytica Chimica Acta*, 354: 197-204.
9. Montero, M.T., Freixas, J., Hernández-Borrell, J. 1997. Expression of the partition coefficients of a homologous series of 6-fluoroquinolones. *International Journal of Pharmaceutics*, 149: 161-170.
10. Park, H-R., Kim, T.H., Bark, K-M. 2002. Physicochemical properties of quinolone antibiotics in various environments. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 37: 443-460.
11. Park, H-R., Chung, K-Y., Lee, H-C., Lee, J-K, Bark, K-M. 2000. Ionization and divalent cation complexation of quinolone antibiotics in aqueous solution. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 21 (9):849-854.
12. Lizondo, M., Pons, M., Gallardo, M., Estelrich, J. 1997. Physicochemical properties of Enrofloxacin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis*, 15: 1845-1849.
13. Vázquez, J.L., Merino, S., Domenech, Ò., Berlanga, M., Viñas, M., Montero, M. T., Hernández-Borrell, J. 2001. Determination of the partition coefficients of a

- homologous series of ciprofloxacin: influence of the N-4 piperazinyl alkylation on the antimicrobial activity. *International Journal of Pharmaceutics*, 220: 53-62.
14. Blondeau, J. M. 1999. Expanded activity and utility of the new fluoroquinolones: A review. *Clinical Therapeutics*, 21 (1): 3-40.
 15. Scholar, E.M. 2002. Fluoroquinolones: Past, present and future of a novel group of antibacterial agents. *American Journal of Pharmaceutical Education*, 66: 164-172.
 16. Drlica, K., Zhao, X. 1997. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61 (3): 377-392.
 17. Piddock, L.J.V., Jin, Y.-F., Ricci, V., Asuquo A.E. 1999. Quinolone accumulation by *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 43: 61-70.
 18. Chapman, J.S., Georgopapadakou, N. H. 1988. Routes of quinolone permeation in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32 (4): 438-442.
 19. Chevalier, J., Malléa, M., Pagès, J-M. 2000. Comparative aspects of the diffusion of norfloxacin, cefepime and spermine through the F porin channel of enterobacter cloacae. *Biochemical Journal*, 348: 223-227.
 20. Hooper, D.C. 1998. Clinical applications of quinolones. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1400: 45-61.
 21. Bayer AG Leverkusen. 1999. Baytril Chemistry.
 22. Deshpande, S.S. 2002. Handbook of Food Toxicology, Chapter 18 New York: Marcel Dekker.
 23. Casarett & Doull's. 2001. Toxicology: The Basic Science of Poisons, Cap. 30. 6th Edition McGraw-Hill.
 24. World Health Organization. 1998. Use of quinolones in food animals and potential impact on human health, WHO/EMC/ZDI/98.10. Report of a WHO meeting, Geneva, Switzerland.
 25. McDermott, P.F., Zhao, S., Wagner, D.D, Simjee, S., Walker, R.D., White, D.G. 2002. The food safety perspective of antibiotic resistance. *Animal Biotechnology*, 13 (1): 71-84.
 26. Collignon, P. Angulo. F.J. 2006. Fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli*: Food for thought. *Journal of Infectious Diseases*, 194 (editorial commentary): 8-10.
 27. Campos, L.S. 2002. Entender a bioquímica, 3ª edição, Escolar Editora.
 28. Lerner, K.L, Lerner, B.W. 2003. World of microbiology and immunology Vol. I & Vol. II. Thomson Gale Editors, USA.

-
29. Van Gelder, P, Dumas, F., Winterhalter, M. 2000. Understanding the function of bacterial outer membrane channels by reconstitution into black lipid membranes. *Biophysical Chemistry*, 85: 153-167.
 30. Kadner, J.R., Franklund, C.V., Lathrop, J.T. 1996. Handbook of biological physics. Chap.28, Vol. II. Elsevier Science B.V, Amsterdam.
 31. Tamm, L.K., Arora, A., Kleinschmidt, J.H. 2001. Structure and assembly of β -barrel membrane proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (35): 32399-32402.
 32. Kayser, F.H., Bienz, K.A., Eckert, J., Zinkernagel, R.H. 2005. Medical microbiology. Thieme Verlag, Stuttgart.
 33. Koebnik, R., Locher, K.P., Van Gelder, P. 2000. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Molecular Microbiology*, 37 (2): 239-253.
 34. Nikaido, H., Rosenberg, E.Y. 1983. Porin Channels in *Escherichia coli*: Studies with liposomes reconstituted from purified proteins. *Journal of Bacteriology*, 153 (1): 241-252.
 35. Nikaido, H. 1993. Transport across the Bacterial Outer Membrane. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 25 (6): 581-589.
 36. Booth, I.R., Jones, M.A., McLaggan, D., Nikolaev, Y., Ness, L.S., Wood, C.M., Miller, S., Tötemeyer, S., Ferguson, G.P. 1996. Handbook of biological physics, Chap. 30, Vol. II, Elsevier Science B.V., Amsterdam.
 37. Saint, N., Lou, K-L., Widmer, C., Luckey, M., Schirmer, T., Rosenbusch, J.P. 1996. Structural and functional characterization of OmpF porin mutants selected for larger pore size, II. Functional characterization. *The Journal of Biological Chemistry*, 271 (34): 20676-20680.
 38. Nikaido, H. 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67 (4): 593-656.
 39. Delcour, A.H. 2003. Solute uptake through general porins. *Frontiers in Bioscience*, 8: 1055-1071.
 40. Nikaido, H. 1994. Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *The Journal of Biological Chemistry*, 269 (6): 3905-3908.
 41. Lou, K-L., Saint, N., Prilipov, A., Rummel, G., Benson, S.A., Rosenbusch, J.P., Schirmer, T. 1996. Structural and functional characterization of OmpF porin mutants selected for larger pore size, I. Crystallographic analysis. *The Journal of Biological Chemistry*, 271 (34): 20669-20675.

42. Danelon, C., Suenaga, A., Winterhalter, M., Yamato, Y. 2003. Molecular origin of the cation selectivity in OmpF porin: single channel conductances vs. free energy calculation. *Biophysical Chemistry*, 104: 591-603.
43. Benz, R., Bauer, K. 1988. Permeation of hydrophilic molecules through the outer membrane of gram-negative bacteria – Review on bacterial porins. *European Journal of Biochemistry*, 176: 1-19.
44. Phale, P.S., Philippsen, A., Kiefhaber, T., Koebnik, R., Phale, V.P., Schirmer, T., Rosenbusch, J.P. 1998. Stability of trimeric OmpF porin: the contribution of the latching loop L2. *Biochemistry*, 37: 15663-15670.
45. Neves, P.S.S. 2007. Sistemas miméticos de biomembranas na caracterização da interação, a nível molecular, de quinolonas com a proteína membrana OmpF. Dissertação submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto para a obtenção do grau de Doutor em Química.
46. O’Keeffe, A.H., East, J.M., Lee, A.G. 2000. Selectivity in lipid binding to the bacterial outer membrane protein OmpF. *Biophysical Journal*, 79: 2066-2074.
47. Wang, Y-Q., Zhang, H-M., Zhang, G-C., Tao, W-H., Tang, S-H. 2007. Interaction of the flavonoid hesperidin with bovine serum albumin: a fluorescence quenching study. *Journal of Luminescence*, 126: 211-218.
48. Pattnaik, B.R., Ghosh and Moganty, S., Rajeswari, R. 1997. Selective excitation of tryptophans in OmpF: A fluorescence emission study. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 41 (1): 173-181.
49. Huang, C-H. 1969. Studies on phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics. *Biochemistry*, 8 (1): 344-351.
50. Lasic, D.D. 1993. *Liposomes from physics to applications*. Elsevier Science B.V, Amsterdam.
51. Sessa, G., Weissmann, G. 1968. Phospholipids spherules (liposomes) as a model for biological membranes. *Journal of Lipid Research*, 9: 310-318.
52. Lorin, A., Flore, C., Thomas, A., Brasseur, R. 2004. Les liposomes: description, fabrication et applications. *Biotechnology Agronomy, Society and Environment*, 8 (3): 163-176.
53. New, R.C.C. 1990. *Liposomes - a practical approach*. Rickwood, D., Hames, B.D., Eds. IRL Press, Oxford.
54. Sharma, A., Sharma, U.S. 1997. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics*, 154: 123-140.

-
55. Jones, M.N., Chapman, D. 1995. *Micelles, monolayers and biomembranas*, Wiley-Liss Inc, New York.
 56. Lasic, D.D. 1998. Novel applications of liposomes. *Trends In Biotechnology*, 16: 307-321.
 57. Rigaud, J-L. 2002. Membrane proteins: functional and structural studies using reconstituted proteoliposomes and 2-D crystals. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 35: 753-766.
 58. Seddon, A., Curnow, P., Booth, P.J. 2004. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1666: 105-117.
 59. Ollivon, M., Lesieur, S, Gabrielle-Madelmont, C., Paternostre, M. 2000. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1508: 34-50.
 60. Valeur, B. 2001. *Molecular Fluorescence-Principles and applications*, Wiley-VCH
 61. Lakowicz, J.R. 1999. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Second edition. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
 62. Kubista, M., Sjöback, R., Eriksson, S., Albinsson, B. 1994. Experimental correction for the inner-filter effect in fluorescence spectra. *Analyst*, 119: 417-419.
 63. De Young, L.R., Dill, K.A. 1988. Solute partitioning into lipid bilayer membranes. *Biochemistry*, 27: 5281-5289.
 64. Lehrer, S.S. 1971. Solute perturbation of protein fluorescence. The quenching of the tryptophyl fluorescence of model compounds and of lysozyme by iodide ion. *Biochemistry*, 10 (17): 3254-3263.
 65. Coutinho, A., Prieto, M. 1993. Ribonuclease T₁ and alcohol dehydrogenase fluorescence quenching by acrylamide: a laboratory experiment for undergraduate students. *Journal of Chemical Education*, 70 (5): 425-428.
 66. Moro, F., Goñi, F.M., Urbaneja, M.A. 1993. Fluorescence quenching at interfaces and the permeation of acrylamide and iodide across phospholipid bilayers. *FEBS*, 330 (2): 129-132
 67. Möller, M., Denicola, A. 2002. Protein tryptophan accessibility studied by fluorescence quenching. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 30 (3): 175-178.
 68. Kaiser, R.D., London, E. 1998. Location of diphenylhexatriene (DPH) and its derivatives within membranes: comparison of different fluorescence quenching analyses of membrane depth. *Biochemistry*, 37: 8180- 8190.

69. Wang, Y-Q., Zhang, H-M., Zhang, G-C., Tao, W-H., Tang, S-H. 2007. Interaction of the flavonoid hesperidin with bovine serum albumin: A fluorescence quenching study. *Journal of Luminescence*, 126: 211-218.
70. Montal, M., Mueller, P. 1972. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA*, 69 (12): 3561-3566.
71. Danelon, C., Lindemann, M., Borin, C., Fournier, D., Winterhalter, M. 2004. Channel-forming membrane proteins as molecular sensors. *IEEE Transactions on Nanobioscience*, 3 (1): 46-48.
72. Danelon, C., Nestorovich, E.M., Winterhalter, M., Ceccarelli, M., Bezrukov, S.M. 2006. Interaction of zwitterionic penicillins with the OmpF channel facilitates their translocation. *Biophysical Journal*, 90: 1617-1627.
73. Merino, S., Domènech, Ò., Viñas, M., Montero, M.T., Hernández-Borrell, J. 2005. Effects of lactose permease on the phospholipids environment in which it is reconstituted: a fluorescence and atomic force microscopy study. *Langmuir*, 21: 4642-4647.
74. Merino-Montero, S., Montero, M.T., Hernández-Borrell, J. 2006. Effects of lactose permease of *Escherichia coli* on the anisotropy and electrostatic surface potential of liposomes. *Biophysical Chemistry*, 119: 101-105.
75. Santos, N.C., Prieto, M., Castanho, M.A.R.B. 2003. Quantifying molecular partition into model systems of biomembranes: an emphasis on optical spectroscopic methods. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1612: 123-135.
76. Rodrigues, C., Gameiro, P., Prieto, M., de Castro, B. 2003. Interaction of rifampicin and isoniazid with large unilamellar liposomes: Spectroscopic location studies. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1620: 151-159.
77. Mansilha, C.I.G.R. 2002. Estudos de partição e localização de fármacos em lipossomas por técnicas espectroscópicas. Dissertação submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto para a obtenção do grau de Doutor em Química.
78. Gaber, M.H. 2005. Physicochemical properties of thermosensitive liposomes encapsulating fluorescein diphosphate. *Romanian Journal of Biophysics*, 14, 43-52.
79. Kitamura, K., Imayoshi, N., Goto, T., Shiro, H., Mano, T., Nakai, Y. 1995. Second derivative spectrophotometric determination of partition coefficients of chlorpromazine and promazine between lecithin bilayer vesicles and water. *Analytica Chimica Acta*, 304: 101-106.

-
80. Omran, A.A., Kitamura, K., Takegami, S., El-Sayed A.-A.Y., Abdel-Mottaleb, M. 2001. Determination of partition coefficients of diazepam and flurazepam between phosphatidylcholine bilayer vesicles and water by second derivative spectrophotometric method, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 25: 319-324.
81. Montero, M.T., Hernández-Borrell, J., Nag, K., Keough, K.M.W. 1994. Fluoroquinolone distribution in a phospholipids environment studied by spectrofluorimetry. *Analytica Chimica Acta*, 290: 58-64.
82. Vázquez, J.L., Montero, M.T., Trias, J., Hernández-Borrell, J. 1998. 6-Fluoroquinolone-liposome interactions: fluorescence quenching study using iodide. *International Journal of Pharmaceutics*, 171: 75-86.
83. Dumas, F., Lebrun, M.C., Tocanne, J-F. 1999. Is the protein/lipid hydrophobic matching principle relevant to membrane organization and functions? *FEBS Letters*, 458: 217-277.
84. Píknová, B., Pérochon, E., Tocanne, J-F. 1993. Hydrophobic mismatch and long-range protein/lipid interactions in bacteriorhodopsin/phosphatidylcholine vesicles. *European Journal of Biochemistry*, 218: 385-396.
85. Lee, A.G. 2003. Lipid/protein interactions in biological membranes: a structural perspective. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1612: 1-40.
86. Chen, X., Fan, J-C., Wang, Y., Fan, C-P., Shang, Z-C. 2006. Fluorometric study on the interaction between Lomefloxacin and bovine lactoferrin. *Analytical Sciences*, 22: 427- 430.
87. Schwarz, G., Danelon, C., Winterhalter, M. 2003. On translocation through a membrane channel via an internal binding site: kinetics and voltage dependence. *Biophysical Journal*, 84: 2990-2998.
88. Nestorovich, E.M., Danelon, C., Winterhalter, M., Bezrukov, S.M. 2002. Designed to penetrate: time resolved interaction of single antibiotic molecules with bacterial pores. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA*, 99 (15): 9789-9794.
89. Bangham, A.D., Standish, M.M., Weissmann, G. 1965. The action of steroids and streptolysin S on the permeability of phospholipid structures to cations. *Journal of Molecular Biology*, 13: 253-259.