

Conclusão

Neste trabalho, estudamos os anestésicos locais dibucaína e tetracaína, os antibióticos norfloxacin e levofloxacin e complexos destes antibióticos com Au (III).

Estudamos o comportamento desses fármacos em função do pH, já que o exame detalhado do equilíbrio de ionização de fármacos em solução é essencial para compreender sua atividade. O comportamento de fármacos, em geral, é fortemente influenciado por suas propriedades físico-químicas, em particular a constante de ionização pK_a . Assim, a atividade química e biológica é dependente do pH. A constante de ionização e o coeficiente de associação do fármaco constituem dados fundamentais para compreender sua absorção biológica e seus receptores e transportadores em nível molecular.

A dibucaína pode existir em três estados de ionização dependendo do pH do meio. Em solução aquosa, podemos ter três espécies moleculares dependendo do estado de ionização da molécula, ou seja, a dicatiônica, em pH ácido, a moncatiônica e a neutra, em pH básico. Determinamos a constantes de ionização, pK_a , da espécie neutra para moncatiônica a partir da fluorescência estacionária e de parâmetros associados aos tempos de vida. Os valores obtidos para a dibucaína foram 8.83 ± 0.02 (fluorescência estacionária) e 9.8 ± 0.1 (fluorescência resolvida no tempo). Notou-se que os valores de pK_a encontrados a partir da fluorescência resolvida no tempo foram maiores do que os obtidos através da fluorescência estacionária.

Desenvolvemos expressões para o pK_a obtido a partir dos fatores pré-exponenciais e das intensidades fracionárias de fluorescência resolvida no tempo. Mostramos que os valores de pK_a são aparentemente deslocados e obtivemos as expressões para correção do deslocamento. Testamos as expressões nos resultados experimentais obtidos com dibucaína e norfloxacin. Os valores calculados através das expressões foram coerentes com os encontrados a partir dos experimentos de fluorescência estacionária e resolvida no tempo, demonstrando a validade das nossas expressões.

Estudamos a interação da dibucaína com membranas enriquecidas em Na^+, K^+ -ATPase. Como a ação dos anestésicos locais se deve à interação das moléculas do anestésico com lipídeos e/ou proteínas de membrana, uma análise desta interação mostra-se necessária para se investigar a difusão do anestésico na membrana e seu efeito na organização e dinâmica dos lipídeos e proteínas que constituem a membrana.

As medidas de fluorescência em soluções de membrana apresentaram distorção no espectro da amostra causada pelo espalhamento da luz. Alguns procedimentos para melhorar as condições experimentais e assegurar a correta análise dos dados foram aplicados. Foram consideradas as seguintes contribuições: (1) contribuição direta da luz de excitação, espalhada na direção do detector de emissão; (2) perda de intensidade de fluorescência devido à atenuação da luz de excitação; (3) perda de intensidade de fluorescência devido à atenuação da luz emitida e (4) aparente deslocamento do espectro de fluorescência para o vermelho devido à forte atenuação da emissão em pequenos comprimentos de onda. Para atenuar ou mesmo eliminar o espalhamento da luz de excitação, foram utilizados polarizadores cruzados na excitação e na emissão. Medidas testes apontaram como melhor configuração de polarizadores a transversal HV. Efeitos de filtro interno também foram considerados.

Investigamos a incorporação dos fármacos dibucaína e da tetracaína às membranas enriquecidas em Na^+, K^+ -ATPase. A incorporação de fármacos nas membranas lipídicas pode ser monitorada por diversos procedimentos. Determinamos a constante de associação a partir de modificações na fluorescência dos próprios fármacos. Os valores obtidos foram $0.9 (\pm 0.2) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ para a dibucaína e $0.8 (\pm 0.2) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ para a tetracaína. Estudamos a acessibilidade dos triptofanos da Na^+, K^+ -ATPase por supressão da fluorescência desses resíduos pela dibucaína. Obtivemos que 90% dos triptofanos são acessíveis a supressão por dibucaína, com uma constante de supressão dinâmica de $4.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

Investigamos também os antibióticos norfloxacin e levofloxacin, assim como seus complexos com ouro, através das suas propriedades de fluorescência. Essas propriedades se modificam dependendo do estado de protonação das moléculas: estado protonado, H_2Q^+ (em meio ácido), com maior rendimento quântico, estado zwitteriônico HQ^\pm (em meio neutro ou fracamente ácido), e na

forma aniônica Q^- (em meio alcalino). As constantes macroscópicas de ionização pK_{a1} e pK_{a2} se referem aos prótons do 3-carboxil e do N distal da 7-piperazina, respectivamente (Fig. 4.6, 4.7).

A norfloxacinina em pH 11.3 apresenta uma fluorescência praticamente nula, indicando que para valores altos de pH temos uma espécie não fluorescente. À medida que o pH diminui a fluorescência aumenta, tendo sua intensidade máxima em pH 7.6 com o pico em 409 nm. Na faixa de pH de 7.2 a 5.0 há uma transição entre duas espécies fluorescentes. Observa-se um deslocamento para o vermelho até 442 nm, com diminuição de intensidade seguida de leve aumento (de pH 5.5 para 5.0). Nessa faixa de pH os espectros puderam ser ajustados como soma dos espectros em pH 7.6 e 5.0, confirmando assim a transição entre duas espécies. Na faixa de pH de 5.0 a 4.0 há uma nova diminuição de intensidade sem deslocamento do pico, sugerindo uma outra transição.

Diferentemente da NF, a AuNF possui uma fluorescência significativa em pH 11.3. À medida que o pH diminui a fluorescência, com pico em cerca de 410 nm, também aumenta, tendo sua intensidade máxima em pH 7.2. Nota-se que a NF apresentou sua intensidade máxima em um valor de $pH = 7.6$. Na faixa de pH de 7.2 a 5.0, como observado na NF, há uma transição entre duas espécies fluorescentes. A diferença é que o pico de fluorescência da espécie que se vai formando com a diminuição do pH é mais intenso que em NF e desloca-se menos, para 435 nm, em vez de 442 nm. Na faixa de 5.0 a 4.0 há uma diminuição de intensidade.

A espécie aniônica da NF não é fluorescente, não dando portanto contribuição para o tempo de vida em pH alto. A espécie zwitteriônica apresentou tempo de vida em torno de 1.2 ns. A espécie catiônica apresentou tempo de vida igual a 1.7 ns.

Para a Norfloxacinina e seu complexo com ouro o pK_{a1} obtido foi o mesmo (6.1 ± 0.1), dentro do erro experimental, tanto por fluorescência estacionária quanto por fluorescência resolvida no tempo. O pK_{a2} , obtido por fluorescência estacionária também foi o mesmo (8.7 ± 0.1). Por fluorescência resolvida no tempo, não foi possível obter o pK_{a2} da NF pura já que a espécie aniônica não é fluorescente.

A NF apresentou baixa intensidade de fluorescência em DMSO com pico de em 438 nm. Já o complexo de AuNF apresentou uma maior largura de banda e

maior fluorescência, com pico em 435 nm. Nota-se uma diferença significativa entre as intensidades da NF e AuNF em DMSO comparado às medidas realizadas em solução aquosa.

Ao contrário da NF, que apresentou apenas um tempo de vida ($\tau_1 = 1.2$ ns) na faixa alcalina, a AuNF apresentou dois tempos de vida: $\tau_1 = 1.15$ ns e $\tau_2 = 1.9$ ns. Esses podem estar associados a dois sítios de coordenação diferentes ou a duas conformações diferentes para o mesmo sítio. Outra hipótese seria associar τ_1 e τ_2 a espécies de NF ligadas e não ligadas ao ouro.

Enquanto as curvas de decaimento de fluorescência da NF foram ajustadas com dois tempos de vida, as de AuNF necessitaram de três tempos. Os dois primeiros, τ_1 e τ_2 ($\tau_1 = 1.2$ ns, $\tau_2 \sim 1.8$ ns) foram muito semelhantes aos da NF pura, mas para a AuNF a contribuição devido ao tempo $\tau_3 = 6.8$ ns mostrou-se significativa.

A levofloxacinina apresenta, qualitativamente, o mesmo comportamento espectroscópico da NF, no entanto há várias diferenças quantitativas. Em pH = 10.5 a LEV apresenta um pico de fluorescência em 467 nm e baixo rendimento quântico. À medida que o pH diminui a fluorescência aumenta muito, tendo sua intensidade máxima em pH = 7.1 (espécie zwitteriônica) com o pico em 448 nm. Na faixa de pH de 7.1 a 4.4 há outra transição. A LEV passa de zwitteriônica para catiônica, com pico em 498 nm de menor intensidade. Abaixo de pH 3.8 inicia-se uma nova diminuição de intensidade sem deslocamento do pico, sugerindo nova transição. Espectros de emissão de fluorescência da AuLEV mostram um comportamento muito similar ao da LEV. A presença do ouro, no entanto, provocou uma diminuição evidente de rendimento quântico na Lev.

Para a LEV e seu complexo com ouro, os pK_{a1} e pK_{a2} obtidos por fluorescência estacionária também foram praticamente iguais (5.8 ± 0.1 e 8.3 ± 0.2 , respectivamente). Os pK_{a2} obtidos por fluorescência resolvida foram maiores (9.3 ± 0.1), o que está de acordo com a expressão para o deslocamento aparente de pK , obtido através da equação 4.27, deduzida nesse trabalho.

Em toda a faixa alcalina de pH de 10.5 a 7.9 as curvas de decaimento de fluorescência da Lev foram ajustadas com duas exponenciais. Os tempos de vida encontrados para as espécies fluorescentes foram $\tau_1 = 0.6$ ns (aniônica) e $\tau_2 = 5.9$ ns (zwitteriônica). Já na faixa de pH de 7.5 a 2.9 as curvas de decaimento

foram ajustadas com exponencial única, omitindo-se a região de tempos da ordem da largura do pulso do LED. Nesse caso, o tempo de vida variou, aumentando à medida que o pH diminuiu, apresentando valores na faixa de 5.8 a 7.2 ns. Os resultados para AuLEV foram muito semelhantes, com a única diferença de que, em relação à LEV, houve uma variação um pouco menor no tempo de vida em função do pH na faixa ácida.

Por fim, cabem algumas considerações. As técnicas de fluorescência estacionária e resolvida no tempo se mostraram como ferramentas eficazes na investigação de fármacos. Os parâmetros associados à análise dos decaimentos de fluorescência puderam ser utilizados para determinar as constantes de protonação pK_a . O modelo matemático elaborado para determinação do pK_a a partir desses parâmetros é simples e as expressões para correção do deslocamento aparente de pK_a são de fácil aplicação. Foi possível caracterizar as propriedades de fluorescência estacionária e resolvida no tempo dos fármacos e dos complexos estudados. A incorporação da dibucaína em membrana enriquecida em Na^+, K^+ -ATPase foi investigada e alguns parâmetros de associação foram determinados. Novas questões emergiram. Assim, novas medidas deverão ser realizadas e outras técnicas deverão ser utilizadas.