

TDUP
99
2007

Patrícia Susana Santos Neves

**Sistemas Miméticos de Biomembranas na Caracterização
da
Interacção, a Nível Molecular, de Quinolonas
com a Proteína Membranar OmpF**



FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO

*Dissertação submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
para obtenção do grau de Doutor em Química*

QD476
NEVp S
2007

Departamento de Química
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
2007



FC

Biblioteca
Faculdade de Ciências
Universidade do Porto



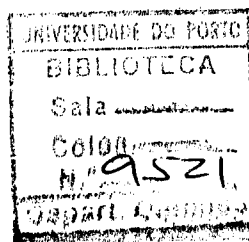
D000119364

Patrícia Susana Santos Neves

**Sistemas Miméticos de Biomembranas na Caracterização da
Interacção, a Nível Molecular, de Quinolonas
com a Proteína Membranar OmpF**



FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO



*Dissertação submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
para obtenção do grau de Doutor em Química*

Departamento de Química
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
2007

Índice Geral

Índice de Figuras	ix
Índice de Tabelas	xvii
Abreviaturas	xix
Agradecimentos	xxi
Resumo	xxiii
Abstract	xxv
Résumé	xxvii
CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO TEÓRICA	3
1. Quinolonas: caracterização geral e enquadramento farmacológico	4
1.1 Introdução histórica e evolução química e farmacológica das diferentes gerações de quinolonas	4
1.2 Caracterização físico-química	7
1.3 Mecanismo de acção e desenvolvimento de resistências	9
1.4 Importância do estudo da interacção das quinolonas com modelos membranares	11
2. Estrutura Bacteriana	13
2.1 Organização estrutural das bactérias	13
2.2 Membrana externa	15
2.3 Proteína F da membrana externa bacteriana: OmpF	16
2.3.1 Caracterização estrutural	16
2.3.2 Selectividade iónica	18
2.3.3 Caracterização físico-química: estabilidade, solubilidade e características espectroscópicas	19
3. Sistemas Miméticos de Membranas Biológicas	22
3.1 Anfipatia e formação de agregados supramoleculares	24
3.2 Lipossomas	26
3.2.1 Estrutura, propriedades e configuração molecular dos fosfolípidos	27
3.2.2 Preparação de Lipossomas	31
3.2.3 Selecção de Sistemas Lipossómicos	34

3.3 Micelas	36
3.3.1 Estrutura, propriedades e configuração molecular dos detergentes	37
3.3.2 Importância das micelas	39
3.3.3 Micelas mistas	39
3.4 Reconstituição de proteínas membranares: Proteolipossomas	40
3.4.1 Metodologias de preparação de proteolipossomas	41
3.4.2 Selecção dos constituintes de uma mistura de reconstituição	46
4. Métodos Experimentais	48
4.1 Coeficientes de partição	48
4.1.1 Determinação de coeficientes de partição por espectrofotometria derivativa de UV-Vis	50
4.1.1.1 Modelos matemáticos para o cálculo dos coeficientes de partição	51
4.1.2 Determinação de coeficientes de partição por espectrofluorimetria	53
4.1.2.1 Modelos matemáticos para o cálculo dos coeficientes de partição	55
4.2 Topografia das interacções em estruturas organizadas	55
4.2.1 Extinção de fluorescência	57
4.2.1.1 Agentes de extinção de fluorescência	61
4.2.1.2 Extinção de fluorescência em estruturas organizadas	63
4.2.1.3 Extinção de fluorescência de proteínas	64
4.2.1.4 Transferência de Energia de Ressonância (RET)	65
4.2.2 Anisotropia de Fluorescência	74
4.2.2.1 Sondas de fluorescência: sondas de fluidez ou de anisotropia de fluorescência	79
4.2.3 Ressonância Paramagnética Electrónica (RPE)	81
4.2.3.1 Sondas utilizadas	84
4.3 Interação Proteína - Ligando: determinação de constantes de associação	85
4.3.1 Considerações gerais	85
4.3.2 Análise de resultados	87
4.3.2.1 Espectroscopia de UV-Vis	90

4.3.2.2	Espectroscopia de fluorescência	91
4.4	Determinação em bicamada lipídica planar (BLP): transposição membranar mediada por canais iónicos (OmpF)	92
4.4.1	Metodologias de preparação de BLP e sua aplicação ao estudo de canais iónicos por técnicas de condutimetria	92
4.4.2	Condutância, selectividade iónica e propriedades electrofisiológicas das porinas: OmpF	95
4.4.3	Difusão membranar através de OmpF avaliada por técnicas de condutimetria	97
CAPÍTULO II: METODOLOGIA EXPERIMENTAL		103
1.	Reagentes e soluções	103
2.	Instrumentação utilizada	105
3.	Preparação de lipossomas	106
4.	Extracção e purificação de OmpF	107
4.1	Avaliação do estado de pureza e estado conformacional de OmpF: SDS-PAGE	108
5.	Preparação de micelas mistas de OmpF: oPOE/DMPC ou DMPG	108
6.	Preparação de proteolipossomas	109
6.1	Estudos preliminares: efeito do oPOE sobre os LUVs de DMPC	109
6.2	Reconstituição por diluição de mistura micelar	110
6.3	Reconstituição por incorporação em lipossomas pré-preparados	110
7.	Granulometria dos lipossomas e proteolipossomas	111
8.	Doseamento dos lípidos	111
9.	Doseamento da proteína	112
10.	Coeficientes de partição	112
10.1	Determinação dos coeficientes de partição por espectrofotometria derivativa de UV-Vis	113
10.2	Determinação dos coeficientes de partição por espectrofluorimetria	113
11.	Estudos de fluidez e localização membranar	114
11.1	Extinção da fluorescência da moxifloxacina pelo ião iodeto	114
11.2	Estudos de anisotropia de fluorescência	114
11.2.1	Variação da anisotropia de fluorescência em presença da moxifloxacina	115
11.2.2	Variação da anisotropia de fluorescência em presença de OmpF	115

11.3 Alterações da fluidez membranar em presença da moxifloxacina avaliados por RPE	115
12. Interação das quinolonas com OmpF: Estudos Espectroscópicos	116
12.1 Extinção da fluorescência de OmpF pela acrilamida e pelo ião iodeto na ausência e em presença das diferentes quinolonas	116
12.2 Constantes de associação quinolona/OmpF	117
12.2.1 OmpF em micelas de oPOE: espectroscopia de UV-Vis	117
12.2.2 OmpF em micelas mistas (oPOE / DMPC ou DMPG) ou em proteolipossomas	117
12.3 Avaliação da transferência de energia de ressonância entre OmpF e a moxifloxacina	118
13. Estudos de condutividade eléctrica de OmpF em presença da moxifloxacina e do ácido nalidíxico.	118
CAPÍTULO III: RESULTADOS	123
1. Partição e Localização da Moxifloxacina em Lipossomas Unilamelares de DMPC e DMPG	124
1.1 Coeficientes de partição da moxifloxacina entre uma solução aquosa e vesículas lipossômicas de DMPC e DMPG	125
1.1.1 Espectrofotometria de UV-Vis	125
1.1.2 Espectroscopia de fluorescência	131
1.2 Localização da fluoroquinolona moxifloxacina em lipossomas de DMPC e DMPG	134
1.2.1 Espectroscopia de fluorescência	134
1.2.1.1 Extinção da fluorescência da moxifloxacina pelo ião iodeto	135
1.2.1.2 Anisotropia de fluorescência	138
1.2.2 Ressonância Paramagnética Electrónica (RPE)	141
1.3 Conclusões	145
2. Reconstituição de OmpF em vesículas lipossômicas de DMPC	148
2.1 Estudos preliminares: efeito do oPOE sobre os LUVs de DMPC	149
2.1.1 Variações da dispersão de Rayleigh	149
2.1.2 Granulometria das estruturas nas diferentes fases de	151

solubilização das vesículas lipossômicas	
2.2 Caracterização dos proteolipossomas obtidos pelas diferentes metodologias experimentadas	153
2.2.1 Granulometria dos proteolipossomas	153
2.2.2 Confirmação da estabilidade da estrutura quaternária nativa de OmpF: SDS-PAGE	155
2.2.3 Conclusões	156
2.3 Evidências de inserção em vesículas lipossômicas de DMPC: proteolipossomas obtidos por inserção de OmpF em LUVs pré-preparados	159
2.3.1 Alterações aos espectros de emissão de fluorescência de OmpF	159
2.3.2 Alterações à organização estrutural das vesículas lipossômicas: anisotropia de fluorescência	161
3. Interação das quinolonas com OmpF	166
3.1 Extinção da fluorescência de OmpF pela acrilamida e pelo ião iodeto na ausência e em presença das quinolonas	166
3.1.1 Estrutura de inserção, composição lipídica e alterações conformacionais	169
3.1.2 Extinção de fluorescência de OmpF inserida em micelas mistas de oPOE/ DMPC ou DMPG, em presença das QNs	173
3.1.3 Extinção de fluorescência de OmpF inserida em proteolipossomas, na presença das QNs	177
3.1.4 Conclusões	179
3.2 Constantes de associação quinolona/ OmpF	181
3.2.1 Meio micelar de oPOE	182
3.2.2 Micelas micelar de oPOE/DMPC ou DMPG	185
3.2.3 Conclusões	190
3.3 Constantes de ligação a partir de determinações de RET entre OmpF e a fluoroquinolona ciprofloxacina	191
3.3.1 Conclusões	194
4. Alterações à condutividade eléctrica de OmpF em presença da moxifloxacina e do ácido nalidíxico	195
4.1 Intensidade de corrente ao longo do tempo	196
4.2 Densidade espectral	197

4.3 Conclusões	201
CAPÍTULO IV: CONSIDERAÇÕES FINAIS	205
BIBLIOGRAFIA	213

Índice de Figuras

Figura I-1	Relação entre a estrutura de base das quinolonas e a estrutura do ácido nalidíxico (Ácido 1-etil-7-metil-1,8-naftiridina-4-ona-3-carboxílico).	5
Figura I-2	Fórmula estrutural da ciprofloxacina (fluoroquinolona de segunda geração).	6
Figura I-3	Fórmula estrutural da fluoroquinolona de terceira geração grepafloxacina.	6
Figura I-4	Fórmula estrutural da moxifloxacina (fluoroquinolona de quarta geração).	7
Figura I-5	Representação esquemática do mecanismo de acção das quinolonas nas células bacterianas de Gram positivo e de Gram negativo.	9
Figura I-6	Fotografias de microscopia electrónica de transmissão das células de <i>B. cereus</i> (A), bactéria de Gram (+), e <i>E. coli</i> (B), bactéria de Gram (-), fixadas com tetróxido de ósmio. MC - Membrana citoplasmática; PC- Parede celular; OM - Membrana externa. Imagem adaptada da referência [13].	14
Figura I-7	Esquema da arquitectura molecular da parede celular das bactérias de Gram (-). Adaptado da referência [13].	14
Figura I-8	Representações esquemáticas da estrutura de OmpF. A) Sequencia de aminoácidos (em código de letras) e disposição membranar em camada β , que constitui a estrutura secundária, na forma distendida; B) Organização da estrutura quaternária sob a forma de trímero, vista de topo da membrana (em cima) e visto ao nível do plano da membrana (em baixo); C) Organização estrutural do monómero (estrutura terciária da proteína) no plano membranar. As designações L e T que surgem nas imagens A) e C) referem-se, respectivamente, às ansas exteriores e às periplasmáticas. Imagens adaptadas da referência [23].	17
Figura I-9	Zona de constrição da porina OmpF (vista perpendicular à direcção da membrana). As cadeias laterais dos aminoácidos carregados da zona de constrição estão representadas a cinzento. A esfera ao centro representa um contra ião ligado ao aminoácido Asp113 (Ácido aspártico, carregado negativamente). Na figura pode ainda ver-se o grupo de aminoácidos catiónicos (Arg-42, Arg-82, Arg-132, Lys-16) e os dois resíduos laterais com grupo carboxílico (Asp-113 e Glu-117) da ansa L3, cuja presença constitui o principal contributo para o forte campo electromagnético da constrição. Adaptado da referência [34].	19
Figura I-10	Representação esquemática das principais estruturas organizadas formadas por agentes anfífilos. Adaptado da referência [49].	24
Figura I-11	Formas moleculares dos agentes anfífilos e respectivas estruturas de agregação. Adaptado da referência [50].	25
Figura I-12	Representação esquemática da estrutura de diferentes tipos de vesículas. Adaptado do sítio da Avanti Polar Lipids, www.avantilipids.com .	27

Figura I-13	Representação esquemática de um fosfoglicerídeo (A) e de um esfingolípido (B), bem como dos principais grupos polares (R) que a eles podem estar associados.	28
Figura I-14	Fórmulas estruturais de dois exemplos de fosfolípidos sintéticos (DMPC e DMPG).	29
Figura I-15	Representação esquemática da organização estrutural apresentada pelas cadeias hidrocarbonadas dos fosfolípidos no estado de cristal-líquido e de gel-sólido.	30
Figura I-16	Representação esquemática da preparação de MLV: 1) dissolução dos lípidos em solvente orgânico; 2) formação do filme lipídico nas paredes do balão, por evaporação à secura do solvente; 3) ressuspensão do filme lipídico em solução aquosa; 4) agitação e obtenção dos MLV; 5) processamento dos MLV por extrusão ou sonicação levando à formação de LUV.	33
Figura I-17	Representação esquemática do processo de extrusão para a obtenção de LUV.	34
Figura I-18	Possíveis localizações de um soluto numa vesícula lipossômica. O significado da numeração da figura é apresentado no texto. Figura adaptada da referência [54].	35
Figura I-19	Representação esquemática dos possíveis locais de ligação de um soluto numa micela. O significado dos números de 1 a 5 é descrito no texto.	36
Figura I-20	Representação esquemática das diferentes estratégias de reconstituição de proteínas membranares em lipossomas. Partindo das membranas biológicas nativas as proteínas membranares podem ser isoladas quer sob a forma de micelas de detergente ou dissolvidas em solvente orgânico. Após terem sido isoladas e purificadas, às proteínas membranares é adicionado um excesso de fosfolípido, procedendo-se à reconstituição proteica em lipossomas de acordo com uma das estratégias salientadas (A, B ou C). Imagem adaptada da referência [83].	42
Figura I-21	Representação esquemática da sobreposição espectral característica de uma situação de RET.	65
Figura I-22	Eficiência de transferência de energia em função da quantidade de aceitador. Comparação das eficiências teóricas e experimentais.	69
Figura I-23	Representação esquemática da localização dos dadores e aceitadores relativamente ao plano membranar e na estrutura proteica. A) Posição dos dadores (Trp ²¹⁴ e Trp ⁶¹) e aceitadores (Ciprofloxacina) na bicamada de DMPC. No modelo estipulado cada um dos monómeros de OmpF é aproximado à forma geométrica de cilindro com um raio de 30 Å. B) Visão de topo do trímero de OmpF, representado de acordo com os pressupostos do modelo de RET assumido. Adaptado da referência [142].	71
Figura I-24	Representação esquemática do trímero de OmpF com destaque para os possíveis locais de ligação da CP, para cada uma das hipóteses formuladas. A) Hipótese I, local de ligação da CP próximo da interface do trímero, completa extinção da fluorescência dos Trp ⁶¹ ; B) Hipótese II, local de ligação da CP na periferia do canal, próximo de um dos Trp ²¹⁴ . Adaptado da referência [142].	73
Figura I-25	Despolarização da radiação emitida por difusão rotacional.	75

Figura I-26	Variação da anisotropia de fluorescência em função do tempo. Linha a tracejado corresponde à lei de Perrin. Os símbolos r_0 , r_∞ e θ correspondem, respectivamente, às designações de valor máximo de anisotropia (ausência de difusão rotacional), valor limite de anisotropia (coerente com uma situação de ambiente anisotrópico) e tempo de correlação rotacional. Adaptado da referência [144].	78
Figura I-27	Fórmula de estrutura do DPH e do TMA-DPH.	80
Figura I-28	Espectro de RPE de uma sonda nitróxido, em ambiente membranar, sujeita a variações de temperatura e, consequentemente, de viscosidade. Análise dos efeitos sobre o tempo de correlação rotacional (t_c). Adaptado da referência [41].	82
Figura I-29	Estruturas químicas das sondas de <i>spin</i> utilizadas. Sondas para RPE obtidas a partir do ácido esteárico marcado com grupos doxil (4,4-dimetil-3-oxazolidinil) nas posições 5 e 16: A) ácido 5-doxil-esteárico (5-DS) e B) ácido 16-doxil-esteárico (16-DS).	84
Figura I-30	Representação teórica, geral, de uma curva de associação. Adaptado da referência [150].	88
Figura I-31	Representação gráfica teórica das formas de linearização não logarítmica da curva de associação. A) Gráfico de Benesi-Hildebrand ou dos recíprocos duplos; B) Gráfico dos recíprocos de y ; C) Gráfico de Scatchard. Adaptado da referência [150].	89
Figura I-32	A) Representação esquemática do dispositivo originalmente descrito por Montal e Müller ⁽¹⁵⁶⁾ para a formação de BLP; B) Formação da bicamada lipídica planar na abertura central do separador. Adaptado da referência [156].	93
Figura I-33	Representação esquemática do procedimento de inserção proteica na bicamada lipídica planar.	94
Figura I-34	Registo característico de corrente iónica através da porina OmpF, reconstituída em bicamada lipídica planar, e por aplicação de diferenças de potencial de 150 mV (A), 100 mV (B) e 50 mV (C). Em (A) é evidenciado o encerramento do canal em três passos aproximadamente iguais, revelando a organização estrutural e funcional de trímero. As linhas tracejadas L_3 , L_2 , L_1 e L_0 correspondem, respectivamente, às posições de canal totalmente aberto, um monómero fechado, dois monómeros fechados e trímero totalmente fechado. Bicamada lipídica formada a partir de uma solução lipídica a 1% de DPhPC. Solução electrolítica contendo KCl (1,0 M) em 5 mM de tampão HEPES (pH 7,0). Adaptado da referência [187].	96
Figura I-35	Efeito modulador da corrente iónica através de OmpF, reconstituída em bicamada lipídica planar, por permeação do antibiótico Ampicilina (AP). Tampão electrolítico contendo 1 M de KCl (pH 6,0); diferença de potencial aplicada foi de - 100 mV. I) Ausência de AP, verifica-se um registo da corrente iónica estável, livre de oscilações mesmo quando observado a maior resolução (registos gráficos à direita); II) Presença de 6 mM de AP, induz maiores oscilações de corrente, e a maior resolução evidenciam-se alguns bloqueios; III) A concentrações elevadas de AP, nota-se uma acentuada oscilação de corrente, e a maior resolução são evidentes numerosos eventos de bloqueio dos canais. Adaptado da referência [192].	98

Figura I-36	Representação gráfica da densidade espectral resultante das oscilações de corrente através da porina OmpF, na ausência (1) e em presença de concentração crescente de antibiótico Ampicilina (2 e 3). Destaca-se a zona de inflexão e respectivo valor de frequência angular (f_c). Porina inserida em bicamada lipídica planar, mergulhada em solução tampão 1M de NaCl, e com a aplicação de uma diferença de potencial de -100 mV. Adaptado da referência [192].	99
Figura II-1	Fotografia (a ₁) e representação esquemática (a ₂) da célula de trabalho das determinações de condutividade eléctrica de OmpF: b) septo de Teflon [®] que separa os compartimentos da célula; c) imagem de microscópio óptico do orifício central, do septo de separação, onde se forma a bicamada lipídica; d) representação da bicamada fosfolipídica com a porina incorporada.	119
Figura II-2	Imagem da organização dos constituintes do dispositivo para as determinações de condutividade iónica: a), b) e c) gaiolas de Faraday; d) célula de vidro; e) eléctrodos; f) bancada de pedra isoladora; g) amplificador de sinal.	120
Figura III-1	Dispersão de luz causada por suspensões de LUVs de DMPC (A) e DMPG (B) em tampão Hepes, de concentrações (μM): (A) (1) 261; (2) 385; (3) 448; (4) 545; (5) 655; (6) 796; (7) 898; (8) 998; (B) (1) 250; (2) 330; (3) 420; (4) 520; (5) 630; (6) 790; (7) 880; (8) 990.	126
Figura III-2	Espectros de absorção da moxifloxacina (30,0 μM) na presença de concentrações crescentes de LUVs de DMPC (A) e DMPG (B). Ver concentrações Figura III-1.	126
Figura III-3	Espectro de segunda derivada da moxifloxacina, sem subtração das referencias (A), espectros de subtração de ordem zero (B), espectros, após subtração, de primeira derivada (C) e de segunda derivada (D).	127
Figura III-4	Espectros de absorção da moxifloxacina (20 μM) na presença de (A) concentrações crescentes de LUVs de DMPC (μM): (1) 0; (2) 261; (3) 385; (4) 448; (5) 545; (6) 655; (7) 796; (8) 898; e de (B) concentrações crescentes de DMPG (μM): (1) 0; (2) 100; (3) 180; (4) 270; (5) 360; (6) 430; (7) 530; (8) 640; (9) 720; (10) 900; Espectro da moxifloxacina na ausência de lípido encontra-se assinalado com o símbolo (Δ).	128
Figura III-5	Segunda derivada dos espectros de absorção da moxifloxacina na ausência (1) e em presença (8 ou 10) de concentrações crescentes de LUVs de DMPC (A) e de DMPG (B). Ver concentrações na Figura III-4. Pontos isobésticos assinalados por (→).	129
Figura III-6	Ajuste da equação (1.5) aos dados experimentais obtidos, pelo método da regressão não linear. Valores relativos à segunda derivada dos espectros de absorção da moxifloxacina em presença de concentração crescentes de DMPC, ao comprimento de onda de 288 nm (A), e de DMPG ao comprimento de onda de 302 nm (B).	130
Figura III-7	Espectro de emissão da moxifloxacina em tampão Hepes, e de suspensões de referência de concentrações crescentes de vesículas unilamelares de DMPC em Hepes (250 μM a 1000 μM). Espectros obtidos após excitação a 288 nm.	131
Figura III-8	Espectros de emissão de fluorescência da moxifloxacina (10 μM) na ausência (1) e na presença (2-10 ou 2-9) de concentrações crescentes de DMPC (A) e DMPG (B). Concentrações de DMPC (μM): (1) 0; (2) 193; (3) 298; (4) 408; (5) 494; (6) 601; (7) 708; (8) 798; (9) 902; (10) 1008. Concentrações de DMPG (μM): (1) 0; (2) 60; (3) 140; (4) 280; (5) 506;	132

(6) 600; (7) 709; (8) 807. Comprimento de onda de excitação de 288 nm.

Figura III-9	Ajuste não linear da equação (2.2) aos valores experimentais obtidos de intensidade de fluorescência da moxifloxacina, ao $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão de 466 nm, em presença de concentração crescentes de DMPC (A) e DMPG (B).	133
Figura III-10	Variação da intensidade de fluorescência da moxifloxacina (3,4 μM) em função da concentração de KI, na ausência ($\circ$) e em presença de 500 μM de DMPC ($\bullet$) e DMPG ($\blacktriangle$). Comprimento de onda de excitação de 288 nm e monitorização da fluorescência a 468 nm.	135
Figura III-11	Representação gráfica da equação de Stern-Volmer para a desactivação de fluorescência da Moxifloxacina pelo ião iodeto, em tampão Hepes na ausência ($\circ$) e em presença de LUVs de DMPC ($\bullet$) e DMPG ($\blacktriangle$), 500 μM .	136
Figura III-12	Espectros de absorção (A) e de excitação de fluorescência (B) da moxifloxacina na presença de concentrações (M) crescentes de ião iodeto (1-5): (1) 0,0; (2) 0,03; (3) 0,07; (4) 0,11; (5) 0,23.	136
Figura III-13	Variação, com a temperatura, da anisotropia de fluorescência (r) das sondas DPH (A) e TMA-DPH (B), incorporadas em LUVs de DMPC (1) e DMPG (2), na ausência ($\square$) e em presença ($\bullet$) da moxifloxacina (18 μM). Cada um dos pontos corresponde ao valor médio de pelo menos três ensaios, distando dos valores obtidos em cada ensaio num máximo de 6 %.	139
Figura III-14	Espectros de RPE das sondas de 16-DS (A) e 5-DS (B), incorporadas em LUVs de DMPC. Espectros traçados à temperatura constante de 37 °C.	142
Figura III-15	Espectros de RPE, traçados à temperatura constante de 37 °C, da sonda 5-DS (39,8 μM) incorporada em LUVs de DMPC (A) ou DMPG (B), na ausência (a) e em presença (b) de 31 μM de moxifloxacina.	144
Figura III-16	Alterações à turbidez das suspensões lipossômicas (1,5 mM DMPC) em presença de concentrações crescentes de oPOE (0-1,1 %), acompanhadas por avaliação da dispersão de luz ao comprimento de onda de excitação e emissão de 450 nm.	150
Figura III-17	Histogramas representativos da distribuição de tamanhos das estruturas (Vesículas em A, B e C; Micelas em D) presentes nas amostras com diferentes concentrações de oPOE. Lipossomas preparados pela metodologia descrita no item 3. (Capítulo II). Concentração de DMPC constante em todas as amostras e igual a 1,5 mM. As diferentes concentrações de oPOE encontram-se descritas no histograma correspondente. As barras dos histogramas A, B e C apresentam-se com uma largura de 10 nm, e em D a largura da barra é de 1 nm.	151
Figura III-18	Histogramas representativos da distribuição de tamanhos dos proteolipossomas obtidos por diferentes procedimentos de reconstituição: (A) inserção proteica em lipossomas pré-preparados; (B) proteolipossomas reconstituídos por diluição de mistura micelar de proteína-detergente-lípido. As barras dos histogramas A e B apresentam-se com uma largura de 20 nm. A polidispersão da amostra A e B é de 0,17 e 0,21 respectivamente.	154
Figura III-19	Resultado da electroforese de amostras contendo OmpF. Em P foi aplicada solução de padrões proteicos evidenciando-se as zonas de peso molecular com relevância para as diferentes conformações de OmpF apresentadas. Em A e B foram aplicadas (1,5 μg) as misturas de reconstituição por inserção em lipossomas pré-preparados e por diluição	155

	da mistura micelar, respectivamente. Em C aplicou-se amostra de micelas mistas de oPOE/DMPC contendo OmpF (1,3 µg). Em D e E aplicou-se solução mãe de OmpF (5,8 µg) em 3 % de oPOE, sujeita a desnaturação por aquecimento a 100 °C, 5 min, em tampão desnaturante (D) e na sua conformação nativa (E).	
Figura III-20	Representação esquemática dos procedimentos de reconstituição membranar de OmpF experimentados, destacando-se a orientação final de inserção: A) reconstituição a partir de mistura micelar; B) Reconstituição por inserção em lipossomas pré-preparados. Adaptado da referência [81].	157
Figura III-21	Esquema representativo da orientação de inserção de OmpF em bicamada planar ou em LUVs pré-preparados (<i>in vitro</i>), comparativamente à orientação de inserção <i>in vivo</i> , na membrana externa bacteriana.	158
Figura III-22	Espectro de emissão de fluorescência de OmpF em meio micelar de oPOE (-●-), em meio micelar de oPOE/DMPC (-Δ-) e inserida em LUVs de DMPC (-□-). Os comprimentos de onda máximos verificados para cada situação foram, respectivamente, 328, 324 e 322 nm ao comprimento de onda de excitação de 290 nm.	160
Figura III-23	Variação, com a temperatura, da anisotropia de fluorescência (r) das sondas DPH (A) e TMA-DPH (B), incorporadas em LUVs (-□-) e em proteolipossomas (-●-) de DMPC. Os valores apresentados são o resultado de pelo menos três determinações independentes, com cada um dos pontos a distar num máximo de 5 % do valor médio apresentado.	162
Figura III-24	Representação esquemática de um monómero de OmpF inserido numa bicamada. Possíveis efeitos da presença da proteína na bicamada: interação electrostática (seta curva) e efeito de ordenamento das cadeias hidrocarbonadas (setas horizontais). Adaptado da referência [275].	164
Figura III-25	Organização estrutural de OmpF. As posições dos resíduos de Trp em cada monómero encontram-se evidenciadas em cada uma das imagens. Em (A) apresenta-se a vista da topo e em (B) uma disposição perpendicular ao eixo membranar. A zona de interface dos monómeros está assinalada, na figura (B), com letra T. Adaptado das referências [206] e [253].	167
Figura III-26	Representação gráfica da relação de Stern-Volmer para a extinção de fluorescência pelo iodeto ao Trp livre (A) em solução micelar de oPOE/DMPC (●) e ao Trp de OmpF (B), com a proteína inserida em micelas mistas de oPOE/DMPC (□) e oPOE/DMPG (▲). Em (A), concentração de Trp é de ~3,1 µM e em (B), a concentração de OmpF é de 0,56 µM.	169
Figura III-27	Representação esquemática da diferente organização estrutural das estruturas de inserção de OmpF. Adaptado da referência [84].	177
Figura III-28	Espectros UV-Vis de OmpF (~2,6 µM) na ausência (P) e em presença de concentrações crescentes (1→7) das quinolonas estudadas. Os espectros representados a tracejado correspondem ao espectro da QN na concentração correspondente mas na ausência de proteína. (A) Ácido nalidíxico (µM): (1) 12,2; (2) 18,4; (3) 26,2; (4) 36,7; (5) 45,9; (6) 52,0; (7) 55,1; (B) Ciprofloxacina (µM): (1) 5,0; (2) 10,0; (3) 14,9; (4) 19,9; (5) 24,9; (6) 29,9; (7) 34,8; (C) Grepafloxacina (µM): (1) 5,6; (2) 10,4; (3) 15,2; (4) 21,7; (5) 26,1; (6) 30,4; (7) 34,8; (D) Moxifloxacina (µM): (1) 4,8; (2) 7,2; (3) 10,7; (4) 17,9; (5) 20,3; (6) 23,8; (7) 35,8;	182

Figura III-29	Tratamento gráfico dos resultados experimentais obtidos para o sistema OmpF:MX, ao comprimento de onda de 278 nm. (A) Ajuste não linear, através do programa Origin 6.1 TM , à equação (9.8) e (B) Ajuste linear à equação dos recíprocos duplos (9.9) ⁽¹⁵⁰⁾ .	183
Figura III-30	Espectros de emissão de fluorescência de OmpF em meio micelar de oPOE/DMPC, na ausência (-, -) e em presença de concentração crescente (1-10) de AN (A), CP (B) e GP (C). Concentração de QN a variar entre 0 a ~35 µM. Comprimento de onda de excitação de 290 nm.	186
Figura III-31	Ajuste linear à equação dos recíprocos duplos (A) e ajuste não linear à isotérmica de ligação de um modelo 1:1 (B), da variação à emissão de fluorescência de OmpF (0,40 µM) em presença de concentrações crescentes de GP (0-35 µM). Comprimentos de onda de excitação de 290 nm e análise efectuada ao comprimento de onda de emissão de 324 nm.	188
Figura III-32	Representações gráficas de: A) Decaimento da intensidade de fluorescência de OmpF por aumento da concentração de CP; e B) Sobreposição do espectro de fluorescência de OmpF (---), com o espectro de absorção da CP (—).	191
Figura III-33	Comparação das eficiências de transferência de energia teóricas e experimentais (●) para o par dador – aceitador: Trp de OmpF – CP, respectivamente. A simulação teórica que assume uma distribuição aleatória de aceptadores (não considerando a possibilidade de ligação) está representada por (---). A) Modelo I: Situação em que se assume a ligação da CP em zona próxima dos Trp ⁶¹ ajuste dos dados experimentais às equações 6.8-6.14. B) Modelo II: Situação que assume a ligação da CP em zona próxima da periferia da proteína, e portanto na proximidade de um dos Trp ²¹⁴ . As simulações que permitem obter os limites superior e inferior do intervalo de K_{Lig} encontram-se representados, respectivamente, por (—) e (.....).	192
Figura III-34	Condutância iónica através de OmpF. A coluna de gráficos da direita (2) consiste numa ampliação de uma fracção de tempo dos traçados gráficos da esquerda (1). A) 150 mM KCl ; B) 150 mM KCl e 6,5 mM de Ácido Nalidíxico; C) 150 mM KCl e 6,5 mM de Moxifloxacina. A diferença de potencial aplicada nestas determinações foi de – 150 mV.	197
Figura III-35	Espectros de densidade espectral para determinações distintas. A curva (--) foi obtida em tampão contendo apenas 150 mM KCl; A curva (---) corresponde à adição de 6,5 mM de AN; A curva (---) corresponde à adição de 6,5 mM de MX.	198
Figura III-36	Espectros de densidade espectral, após subtracção do ruído de fundo, de uma determinação envolvendo sucessivas adições de Moxifloxacina.	199
Figura III-37	Frequência Angular (f_c) obtida a partir dos espectros de densidade espectral para diferentes concentrações de MX, em adições ao lado “cis” e ao lado “trans”. Ajuste linear à equação (10.2), tendo-se obtido valores de k_{Lig} e k_{Dis} de $160000\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ e 20000 s^{-1} , respectivamente.	200

Índice de Tabelas

Tabela I-1	Estruturas e algumas propriedades físico químicas relevantes das quinolonas utilizadas nos diversos estudos efectuados. Os valores de pK_{a1} e pK_{a2} referidos na tabela foram extraídos das seguintes referências: NA [8]; CP [7]; GP [11]; MX [10].	8
Tabela I-2	Composição de algumas membranas celulares animais e de bactérias. As abreviaturas usadas têm o seguinte significado: PC-fosfatidilcolina; PE-fosfatidiletanolamina; PG-fosfatidilglicerol; PI-fosfatidilinositol; Col-colesterol; SM-esfingomielina. Valores da tabela obtidos das referências [13] e [21]	22
Tabela I-3	Exemplos de detergentes das diversas classes em que se agrupam.	38
Tabela III-1	Intervalos de concentração onde se verifica a lei de Lambert-Beer para a MX em tampão Hepes. Valores obtidos ao comprimento de onda de máxima absorção/emissão.	125
Tabela III-2	Coeficientes de partição da moxifloxacina entre uma fase aquosa de tampão Hepes e a fase lipídica membranar de DMPC e DMPG, obtidos por espectrofotometria derivativa de UV-Vis.	131
Tabela III-3	Coeficientes de partição da moxifloxacina entre uma fase aquosa de tampão Hepes e a fase lipídica membranar de DMPC e DMPG, obtidos por espectrofluorimetria.	133
Tabela III-4	Valores das constantes de Stern-Volmer para a extinção de fluorescência da moxifloxacina pelo ião iodeto, na ausência e em presença de LUVs de DMPC e DMPG.	137
Tabela III-5	Temperaturas de transição de fase (T_m) e valores de parâmetro de ordem (S) para o DMPC e DMPG, na ausência e em presença da moxifloxacina (MX). O parâmetro de ordem foi calculado através da equação (6.4) ⁽¹⁴⁴⁾ , à temperatura de 22 °C, e a T_m foi obtida a partir do ponto de inflexão do modelo sigmoidal representado na Figura III-13.	140
Tabela III-6	Valores de tempos de correlação (t) para a sonda 16-DS, incorporada em LUVs de DMPC e DMPG.	143
Tabela III-7	Valores do parâmetro de ordem (S) e desdobramento hiperfino máximo ($2A_{máx}$) para a sonda 5-DS incorporada em LUVs de DMPC e DMPG, na ausência e em presença da moxifloxacina.	144
Tabela III-8	Valores médios de tamanho das estruturas presentes nas suspensões, e respectivos índices de polidispersão, para diferentes concentrações de oPOE.	152
Tabela III-9	Desvios espectrais verificados nos espectros de emissão de fluorescência de OmpF em diferentes fases de reconstituição membranar. ^a A comparação efectuada atende apenas à variação do $\lambda_{máx}$ de emissão e não aos diferentes valores de $\lambda_{máx}$ apresentados. ^b Valores obtidos da referência [262], ao comprimento de onda de excitação de 290 nm.	161

Tabela III-10	Temperaturas de transição de fase (T_m) para lipossomas de DMPC e proteolipossomas OmpF/DMPC. Valores obtidos a partir do ponto de inflexão do modelo sigmoidal representado na Figura III-23. Os valores correspondem à média e desvio padrão de pelo menos três ensaios independentes.	163
Tabela III-11	Valores das constantes de Stern-Volmer (K_a) e fracção acessível (f_a) para a extinção de fluorescência pelo iodeto e pela acrilamida ao Trp e a proteína OmpF, nos diferentes meios micelares em que se efectuou o estudo.	169
Tabela III-12	Comparação da extinção de fluorescência pelo iodeto e pela acrilamida, à fluorescência do Trp livre, em meio de solução micelar de oPOE/DMPC, e de OmpF inserida em micelas mistas de oPOE/DMPC e em proteolipossomas de DMPC.	172
Tabela III-13	Constantes de Stern-Volmer e respectivas fracções de fluorescência acessíveis, da extinção de fluorescência pela acrilamida e pelo iodeto aos Trp de OmpF inserida em meio micelar. A primeira coluna descreve o agente de extinção usado e a componente lipídica do sistema micelar. As concentrações de antibiótico usadas foram (μM): 27,9 (AN), 26,9 (CP), 27,9 (GP) e 27,9 (MX). Os valores expostos correspondem à média e desvio padrão de pelos três ensaios independentes.	175
Tabela III-14	Constantes de Stern-Volmer e respectivas fracções de fluorescência acessíveis, da extinção de fluorescência pela acrilamida e pelo iodeto aos Trp de OmpF inserida em LUVs de DMPC. A coluna da esquerda descreve o agente de extinção usado. As concentrações de antibiótico usadas foram (μM): 26,6 (AN), 26,9 (CP), 27,9 (GP) e 27,9 (MX). Os valores expostos correspondem à média e desvio padrão de pelos três ensaios independentes.	178
Tabela III-15	Valores das constantes de associação obtidas para a interacção das quinolonas com OmpF. Os resultados correspondem à média de pelo menos três determinações independentes e os erros associados correspondem aos respectivos desvios padrão. a) Valores obtidos por ajuste à equação 9.8.	184
Tabela III-16	Desvios espectrais verificados por adição de quantidade crescente de QN a quantidade constante de OmpF inserida em diferentes meios micelares. A variação verificada manifestou-se para comprimentos de onda menores.	186
Tabela III-17	Valores obtidos para as constantes de associação OmpF/QN. Resumo de resultados obtidos para os diferentes meios micelares de inserção de OmpF, e através de ajuste não linear da equação 9.11 aos valores experimentais obtidos.	189
Tabela III-18	Limites, superior e inferior, para os valores de K_{PC} , para cada um dos locais de ligação considerados em análise. Modelo I: Ligação da CP em zona próxima da interface dos trímeros. Modelo II: Ligação da CP na periferia do canal, na proximidade da interface OmpF/lípidos. Os limites superior e inferior correspondem, respectivamente, ao melhor ajuste à maior e à menor concentração de CP utilizada.	193

Resumo

Os estudos efectuados tiveram como objectivo central o esclarecimento a nível molecular das principais vias de entrada do grupo de antibacterianos quinolonas, na célula bacteriana.

O conhecimento da capacidade destes fármacos em permearem ou simplesmente interagirem com as bicamadas lipídicas, é de grande importância para o esclarecimento do papel desempenhado pela componente lipídica na transposição membranar das quinolonas. Assim, numa primeira abordagem quantificou-se a interacção de um dos mais recentes membros deste grupo de fármacos com a componente lipídica através da determinação de constantes de partição entre uma fase aquosa e vesículas lipossómicas de diferentes composições lipídicas. Uma vez que o grau de partição de um composto não permite obter qualquer informação topográfica da interacção desenvolvida, o tipo, orientação e extensão dessa interacção foi averiguado através de estudos de localização membranar. Este estudo foi efectuado apenas para a moxifloxacina, pois tratando-se de uma quinolona relativamente recente não foi possível encontrar este tipo de informação disponível na literatura.

Uma vez averiguado e quantificado o grau de interacção com a componente lipídica, passou-se à determinação da afinidade de quinolonas de diferentes gerações pela porina OmpF, cuja importância para entrada das quinolonas na célula bacteriana tem sido evidenciada em estudos microbiológicos mas cuja interacção carece ainda de esclarecimento ao nível molecular. Para melhor se compreender a interacção desta porina com as diferentes quinolonas em estudo, iniciou-se a abordagem pela determinação da afinidade intrínseca de cada uma das quinolonas pela proteína, tendo-se efectuado estes primeiros estudos sem intervenção da componente lipídica e com objectivo de se obter uma relação entre as diferentes gerações em estudo, seu espectro de acção e respectiva afinidade por OmpF. Posteriormente, os diferentes locais de interacção com a porina foram indirectamente averiguados recorrendo a estudos de extinção de fluorescência com agentes de extinção de acessibilidade diferenciada e tendo-se complementado o modelo de estudo com componentes lipídicas de diferentes características, obtendo-se assim informação de possíveis efeitos moduladores da componente lipídica sobre a interacção com a porina. Esta interacção com OmpF foi, numa fase seguinte, quantificada através do cálculo de

constantes de associação fármaco/proteína, obtidas em presença de diferentes componentes lipídicas.

Dos estudos efectuados com as diferentes quinolonas tornaram-se evidentes dois comportamentos distintos quanto à interacção com a porina:

1) Desenvolvimento de interacção com OmpF em consequência de um mero aproveitamento da sua interface membrana numa permeação por via hidrofóbica (comportamento apenas evidenciado pelo AN);

2) Interacção com OmpF ao nível do interior do canal hidrofílico da porina (comportamento evidenciado pelas restantes QN);

Como forma de evidenciar uma eventual passagem através do canal hidrofílico ou uma mera afinidade por áreas superficiais da proteína, estudou-se o efeito da presença quer do AN, quer da MX, na condutividade eléctrica de OmpF. A interrupção da corrente iónica através de OmpF quando em presença dos fármaco e consequente aumento do número e frequência destes eventos com o aumento da concentração de antibiótico são associados à passagem deste através do canal porínico. Para a CP foi ainda possível obter um esclarecimento adicional do seu local de interacção por recurso a estudos de RET, onde se evidenciou com maior detalhe a possível zona de interacção desta QN com o canal hidrofílico da porina.

Abstract

Quinolones are among the most used antibiotics, nevertheless, despite their widespread in clinical antibiotherapy, there is a lack of information on the molecular mechanism of quinolone entry in the bacteria. The present work is inserted in this perspective with the main goal of obtaining knowledge at a molecular level about the major pathways of entry of the quinolones antibiotics into the bacterial cell. As the route for the uptake of the quinolone is strictly related with their structure and hydrophobicity the studies performed also investigated the possible relations between the structural differences and the preferred pathway and efficiency of entry in the bacteria.

The information on the intrinsic property of this drugs in permeate or simply interact with a phospholipid bilayer is of great importance for a better understanding of the functions of a lipid component in the membranar translocation of quinolone. So, as a first approach, the interaction of moxifloxacin with a lipid component was quantified by the determination of partition constants between an aqueous phase and a lipid phase constituted of liposomes of different compositions. Then, the interaction between this drug and the bilayer was better defined by studies of membranar location, which allowed for a better topographic definition, as well as gains in information about the extension and orientation of the interaction developed.

OmpF is a porin of recognized importance in the entry of this group of antibiotics in the Gram (-) bacterial cell, fact always evident in microbiologic studies but never defined at a molecular level. In this context, after quantifying the degree of interaction with the lipid component the role of quinolone interaction with OmpF was investigated by picking one representative member of each generation of this large group of antibiotics, and promoting contact with some amount of purified porin. These results were, first, expressed in a value of a binding constant between the quinolone and OmpF that was representative of the intrinsic affinity of the drugs for the protein. These studies were done with the protein in detergent, with the objective of obtaining a relation between the evolution of the different generations and their relative affinity for OmpF.

After this, using quenchers with distinct accessibilities, the intrinsic tryptophan fluorescence of OmpF allowed indirectly the investigation of possible sites for protein/drug interaction. This study was complemented by the use of different lipid components which

gave access to information on possible modeling effects of the lipids in the interaction with the porin.

In subsequent studies, this interaction with OmpF was quantified by the determination of drug/protein binding or association constants, obtained in presence of the different lipid components.

From all the studies performed, it became clear the interaction of quinolones with OmpF must occur by two different pathways. As a way to distinguish between a passage through the hydrophilic channel or by the lipid/protein interface, some of the antibiotics were further tested by different methodologies.

For the fluoroquinolone ciprofloxacin, the extent of Förster resonance energy transfer between this drug and OmpF, associated with a rational modeling of the distribution of donor and acceptor in the three dimensional space of the bilayer, allowed the quantification of the extent of binding between the protein and the antibiotic and its possible location on the vicinity of Trp²¹⁴.

For nalidixic acid and moxifloxacin, quinolones with the most opposite behavior, the effect of their presence in the electric conductivity of OmpF was evaluated. The interruption of the ionic current through OmpF in presence of moxifloxacin and the consequent increase of the number and frequency of those events with the increase in the antibiotic concentration is a direct evidence of its passage through the porin channel. On the other hand, the absence of changes on OmpF conductance in presence of nalidixic acid suggests that the interaction of this quinolone with the porin is not in the hydrophilic channel.

Résumé

Les quinolones sont parmi les antibiotiques les plus utilisés, cependant, malgré leur utilisation répandue en antibiothérapie clinique, il existe un manque d'informations sur le mécanisme moléculaire de leur entrée dans les bactéries. Le présent travail trouve sa place dans cette perspective et a pour but principal d'obtenir des connaissances sur le cheminement des quinolones dans la cellule bactérienne à un niveau moléculaire.

Etant donné que l'incorporation des quinolones est corrélée à leur structure et leur balance hydrophilie/lipophilie, les études ont également cherché les relations possibles entre les différences structurales et le cheminement préférentiel ainsi que l'efficacité de l'entrée dans les bactéries.

Les informations sur les propriétés intrinsèques de ces médicaments concernant la perméabilité ou simplement l'interaction avec une bicouche lipidique sont de tout premier ordre pour une meilleure compréhension des fonctions de la composante lipidique dans la translocation membranaire des quinolones. Ainsi, en première approche, l'interaction de la moxifloxacin avec un composé lipidique a été quantifiée par la détermination des coefficients de partage entre une phase aqueuse et une phase lipidique constituée de liposomes de composition variée. Ensuite, l'interaction entre ce médicament et la bicouche a été mieux définie par des études de localisation membranaire, qui ont permis une meilleure définition topographique, ainsi qu'un gain d'informations sur l'extension et l'orientation de l'interaction développée.

L'OmpF est une porine d'une importance avérée dans le cheminement de ce groupe d'antibiotiques dans les cellules bactériennes du groupe Gram(-), un fait évident du point de vue des études microbiologiques mais qui n'a jamais été défini sur un plan moléculaire. Dans ce contexte, après quantification de l'interaction avec la composante lipidique, le rôle de l'interaction OmpF/quinolone a été étudié en choisissant un représentant de chaque génération de ce vaste groupe d'antibiotiques, et en induisant le contact avec une quantité de porine purifiée. Ces résultats furent, dans un premier temps, exprimés sous la forme d'une constante de liaison représentative de l'affinité intrinsèque entre la quinolone considérée et l'OmpF. Ces études ont été menées dans un mélange de protéine et de détergent avec pour objectif d'obtenir une relation entre l'évolution des différentes générations et leur affinité pour l'OmpF.

Ensuite, l'utilisation de "quenchers" aux accessibilités distinctes, la fluorescence intrinsèque des résidus tryptophane de l'OmpF a permis l'étude indirecte des sites possibles d'interaction protéine/médicament. Cette étude a été complétée par l'utilisation de différents composés lipidiques qui a donné accès à des informations sur le possible effet de la nature des lipides sur l'interaction avec la porine.

Dans les études suivantes, cette interaction avec l'OmpF a été quantifiée par la détermination des constantes de liaison ou d'association entre le médicament et la protéine, obtenues en présence des différents composants lipidiques.

D'après toutes les études menées, il est devenu clair que l'interaction entre les quinolones et l'OmpF doit intervenir par deux modes différents. Pour faire la distinction entre un passage par le canal hydrophile ou par l'interface lipides/protéine, quelques antibiotiques ont été ensuite testés par différentes méthodologies.

Pour la fluoroquinolone ciprofloxacine, les mesures de FRET entre cette molécule et l'OmpF, associées à une modélisation de la distribution des couples donneur/accepteur dans l'espace de la bicouche, ont permis la quantification de la force de liaison entre la protéine et l'antibiotique et sa localisation potentielle aux alentours du résidu Trp²¹⁴.

L'acide nalidixique et la moxifloxacine, des quinolones aux comportements les plus opposés, l'effet de leur présence sur la conductivité électrique de l'OmpF a été évalué. L'interruption du courant ionique au travers de l'OmpF en présence de moxifloxacine et l'augmentation du nombre et de la fréquence de ces événements en résultant ainsi que l'augmentation de la concentration en antibiotique est une preuve directe de son passage au travers du canal de la porine. D'autre part, l'absence de changement de la conductance de l'OmpF en présence d'acide nalidixique suggère que l'interaction de ce dernier avec la porine ne se produit pas dans le canal hydrophile.

***CAPÍTULO I:* INTRODUÇÃO TEÓRICA**

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO TEÓRICA

Neste capítulo inicial serão abordados alguns conceitos teóricos considerados relevantes para um bom enquadramento dos estudos efectuados e da sua importância no panorama em que se enquadra esta dissertação. Salienta-se que a selecção e modo de abordagem de cada um dos temas focados visa essencialmente a compreensão dos procedimentos, resultados e conclusões que se descrevem nos capítulos subsequentes.

No primeiro dos tópicos abordados é feita uma apresentação dos fármacos estudados, seu enquadramento farmacológico, suas propriedades físico-químicas e o paralelismo destas com a sua actividade farmacológica, o seu mecanismo de acção e consequentemente a importância dos estudos efectuados no melhoramento da compreensão da sua actividade. No tópico seguinte faz-se uma breve apresentação da ultraestrutura bacteriana, com especial relevo para as diferentes estruturas membranares e seus componentes constitucionais, destacando-se, posteriormente, a porina OmpF cuja interacção com as QNs representa ponto essencial dos estudos realizados. Os restantes pontos deste capítulo dizem respeito quer às metodologias experimentais, quer aos modelos membranares a que se recorreu ao longo dos estudos efectuados.

1. Quinolonas: caracterização geral e enquadramento farmacológico

As quinolonas integram um vasto e heterogéneo grupo genericamente designado de antibióticos. A propriedade comum a todos os membros deste grupo farmacológico é a sua acção antibacteriana tratando-se, portanto, de fármacos usados no tratamento e profilaxia de infecções bacterianas.

Este grupo de antibióticos constitui uma importante arma terapêutica no combate a diversos grupos bacterianos patogénicos, abrangendo desde estirpes de Gram (-) a Gram (+), e para as fluoroquinolonas mais recentes o seu espectro antibacteriano chega a incluir estirpes anaeróbias e mesmo estirpes ultraestruturalmente distintas como o *Mycobacterium tuberculosis*. A sua actividade bactericida de largo espectro, aliada a uma boa biodisponibilidade após administração oral, a excelente difusão tecidular, tempos de semi-vida relativamente longos e o seu perfil de segurança favorável, constituem características que tornam as fluoroquinolonas fármacos de primeira escolha no tratamento de numerosas infecções.

1.1 Introdução histórica e evolução química e farmacológica das diferentes gerações de quinolonas

As quinolonas, grupo de antibacterianos de origem sintética, foram descobertas acidentalmente ao longo do processo de síntese da cloroquina, um importante agente antimalárico. O primeiro de uma série de derivados das 1,8-naftiridinas, também chamadas de 4-quinolonas foi o ácido nalidíxico, ácido 1-etil-7-metil-1,8-naftiridina-4-ona-3-carboxílico, descrito por Lesher e seus colaboradores em 1962 ⁽¹⁾.

Todas as quinolonas com actividade antibacteriana têm um núcleo 4-quinolona com um azoto na posição 1, um grupo carboxílico na posição 3 e o grupo cetona na posição 4 (Figura I-1). Como se referiu, o primeiro membro da classe das quinolonas foi o ácido nalidíxico, porém, a sua actividade antibacteriana evidenciou-se bastante limitada ⁽²⁾, resumindo-se a uma acção bactericida contra a maioria das bactérias de Gram (-) comumente associadas às infecções do trato urinário (embora a *Pseudomonas aeruginosa* lhe seja resistente), e sendo relativamente ineficaz contra as bactérias de Gram (+) (exemplo: *Staphylococcus*). Assim, o ácido nalidíxico é usado sobretudo no tratamento de infecções urinárias, embora a sua eficácia seja posta em causa, em caso de infecções complicadas, pelo facto de promover a selecção de bactérias resistentes. Adicionalmente, a

sua administração oral não produz concentrações intracelulares adequadas ao tratamento de infecções sistêmicas e quando administrado intravenosamente, nas doses necessárias ao tratamento de tais infecções, revela toxicidade cardíaca e do sistema nervoso central ^(1,2).

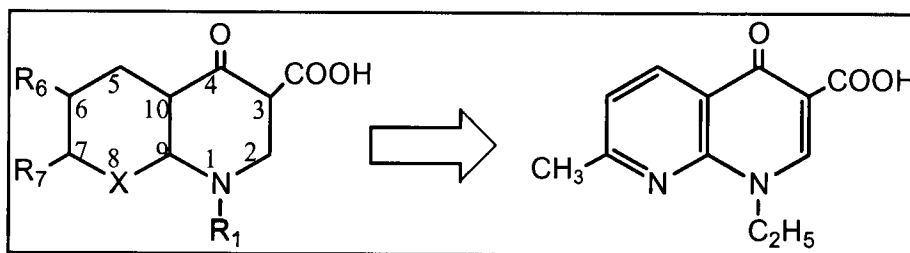


Figura I-1: Relação entre a estrutura de base das quinolonas e a estrutura do ácido nalidíxico (Ácido 1-etil-7-metil-1,8-naftiridina-4-ona-3-carboxílico).

Outras quinolonas de primeira geração (cinoxina e ácido oxolínico) foram desenvolvidas partindo de estruturas semelhantes à do ácido nalidíxico, tendo demonstrado alguma vantagem como seja, um maior período de semi-vida e consequentemente um maior intervalo entre doses. Contudo, o seu espectro de actividade manteve-se similar ao do ácido nalidíxico ⁽³⁾.

Foi durante a década de 70 que surgiram as primeiras fluoroquinolonas. Todas as fluoroquinolonas (segunda, terceira e quarta geração de quinolonas) têm um átomo de flúor na posição 6, o que lhes confere uma maior potência antibacteriana e um espectro de actividade mais alargado, do que aquele que se verificava com o ácido nalidíxico e outras quinolonas não fluoradas, demonstrando-se activas contra bactérias aeróbias de Gram (+) (incluindo *Staphylococcus*) e a maioria das bactérias aeróbias de Gram (-), incluindo *Enterobacteriaceae* (exemplo: *Escherichia coli*) e a *Pseudomonas aeruginosa* ^(4,5).

As modificações características das fluoroquinolonas de segunda geração estão associadas à presença de um anel piperazínico na posição 7 e a alterações na cadeia lateral da posição 1 (Figura I-2). Estas fluoroquinolonas incluem no seu espectro de acção bactérias de Gram (-), como a *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Moraxella catarrhalis* e bactérias de Gram (+), como *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* ^(4,5).

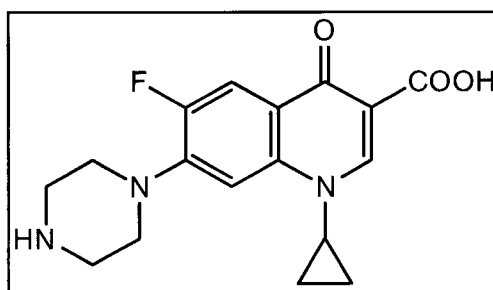


Figura I-2: Fórmula estrutural da ciprofloxacina (fluoroquinolona de segunda geração).

Outras modificações na estrutura das fluoroquinolonas desencadearam o aparecimento das fluoroquinolonas de terceira geração das quais se destacam, por exemplo, a grepafloxacina e a levofloxacina (Figura I-3). Estas novas fluoroquinolonas apresentam um espectro de actividade antibacteriana ainda mais alargado (incluindo actividade contra *Streptococcus*), maior potência (isto é, apresentam uma diminuição na concentração inibitória mínima) e um tempo de semi-vida mais longo (permitindo uma única toma diária) ⁽³⁾.

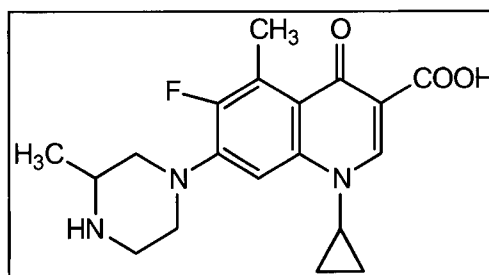


Figura I-3: Fórmula estrutural da fluoroquinolona de terceira geração grepafloxacina.

Por último, na década de 90, surgiram as fluoroquinolonas de quarta geração (exemplos: moxifloxacina, gatifloxacina e trovafloxacina) cujo espectro de acção cobre até microrganismos anaeróbios ⁽³⁾. A introdução de um grupo metoxi na posição 8 da gatifloxacina e da moxifloxacina (Figura I-4) é, teoricamente, associado a uma maior actividade contra bactérias de Gram (+) resistentes às restantes classes antibacterianas e também à redução na selecção de mutantes resistentes ⁽⁶⁾.

A moxifloxacina apresenta ainda um anel diazobiciclonil na posição 7 (Figura I-4) que lhe confere um alargamento do espectro de actividade (que passa a incluir *S. pneumoniae*), um aumento da potência e do tempo de semi-vida ⁽⁶⁾.

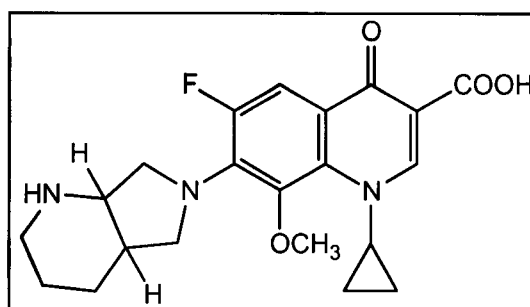


Figura I-4: Fórmula estrutural da moxifloxacina (fluoroquinolona de quarta geração).

As quinolonas evoluíram de agentes usados apenas para o tratamento de infecções urinárias para moléculas com espectros de actividade alargados e forte potência antibacteriana. As modificações sucessivas na sua configuração molecular resultaram num aumento acentuado da sua potência e melhoraram a sua farmacocinética tornando-as armas terapêuticas de grande importância na actualidade. As fluoroquinolonas apresentam uma excelente biodisponibilidade oral e tempos de semi-vida relativamente longos. Encontram-se em concentrações elevadas na urina, rins, tecido prostático e fezes, embora a sua eliminação se processe essencialmente por via renal. São fármacos de primeira escolha no tratamento de infecções urinárias complicadas, infecções prostáticas, infecções genitais por gonococcus, infecções gastrointestinais, algumas infecções respiratórias e infecções osteo-articulares causadas por microorganismos de Gram (-).

1.2 Caracterização físico química

O comportamento *in vivo* das quinolonas é fortemente afectado pelas suas propriedades físico-químicas, em particular as suas propriedades ácido/base, a sua capacidade em complexar iões metálicos e o seu carácter hidro/lipofílico ⁽⁷⁾.

A influencia do pH na actividade antibacteriana das quinolonas acontece a vários níveis, afectando desde a permeação na célula bacteriana até à inibição da DNA girase (o seu alvo de acção) processo fortemente condicionado pela quantidade de ácido ⁽⁸⁾. A existência de múltiplos locais de protonação na estrutura das quinolonas, origina um padrão de equilíbrios ácido/base com alguma complexidade, tornando propícia a existência de mais de uma espécie química a determinado pH o que, obviamente, influencia o comportamento farmacológico destes fármacos. Numerosos estudos têm evidenciado que do ponto de vista biológico os grupos químicos de maior importância são o grupo carboxílico e o grupo 4' – amino do anel piperazínico. Assim, a pH fisiológico (~7,4) a espécie química predominante é a forma de ião dipolar embora, em maior ou menor

percentagem, consoante a estrutura em causa, também possam coexistir a forma catiónica e aniónica ⁽⁹⁾. A análise das constantes de acidez de variados exemplos de quinolonas (Tabela I-1) revela alguma similaridade de valores revelando apenas ligeiras variações, contudo, estas pequenas diferenças originam variações significativas no que respeita às diferentes espécies químicas que coexistem a pH fisiológico. Por exemplo, no caso concreto da moxifloxacina, fluoroquinolona cuja partição foi estudada ao longo deste trabalho, os estudos efectuados ⁽¹⁰⁾ apontam para a coexistência, a pH 7,4, de 93 % de fármaco sob a forma de ião dipolar e de 7 % sob a forma catiónica, já a grepafloxacina ⁽¹¹⁾ apresenta-se 75% sob a forma de ião dipolar, 20 % de forma catiónica e 5 % de forma aniónica, enquanto que a ciprofloxacina dispõe-se 90 % sob a forma de ião dipolar e 10 % na forma aniónica.

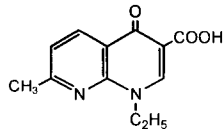
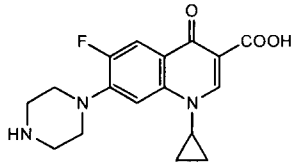
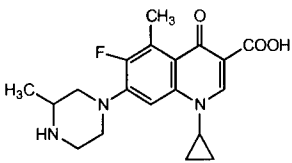
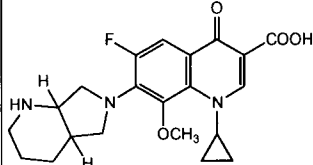
QN	Fórmula Estrutural	PM	pK _{a1}	pK _{a2}	Espécies químicas presentes a pH 7,4
AN		232	6,41±0,09	—	Aniónica
CP		386	6,15±0,15	8,66±0,11	90% Ião dipolar 10% Aniónica
GP		423	6,68±0,06	8,33±0,07	75% Ião dipolar 20% Catiónica 5% Aniónica
MX		401	6.23±0.02	9.53±0.03	93% Ião dipolar 7% Catiónica

Tabela I-1: Estruturas e algumas propriedades físico químicas relevantes das quinolonas utilizadas nos diversos estudos efectuados. Os valores de pK_{a1} e pK_{a2} referidos na tabela foram extraídos das seguintes referências: NA [8]; CP [7]; GP [11]; MX [10].

O aumento do peso molecular, da hidrofobicidade e da quantidade de fármaco sob a forma aniónica a pH 7,4, compromete a entrada destes antibióticos na célula bacteriana de Gram (-) pela via porínica, consequentemente as estruturas mais hidrofóbicas estão

associadas a uma permeação por difusão através dos lipopolissacarídeos. Paralelamente, nas bactérias de Gram (+) que são desprovidas de membrana externa a entrada das quinolonas só poderá acontecer por difusão através da membrana celular. Assim, quinolonas com diferentes estruturas químicas, isto é, com diferentes substituintes na estrutura de base, exibem respostas antibacterianas distintas ⁽¹²⁾. Especificamente, as quinolonas de primeira geração (ex: ácido nalidíxico) relativamente às quinolonas das gerações subsequentes apresentam espectros antibacterianos bastante distintos, pois também as propriedades físico-químicas destes dois grupos são bastante diferentes.

1.3 Mecanismo de acção e desenvolvimento de resistências

As quinolonas actuam por inibição selectiva e reversível da síntese e replicação do ácido desoxirribonucleico (DNA), bloqueando uma transição estrutural da enzima DNA girase e inibindo a topoisomerase IV ⁽⁵⁾, duas enzimas essenciais aos processos acima referidos (Figura I-5).

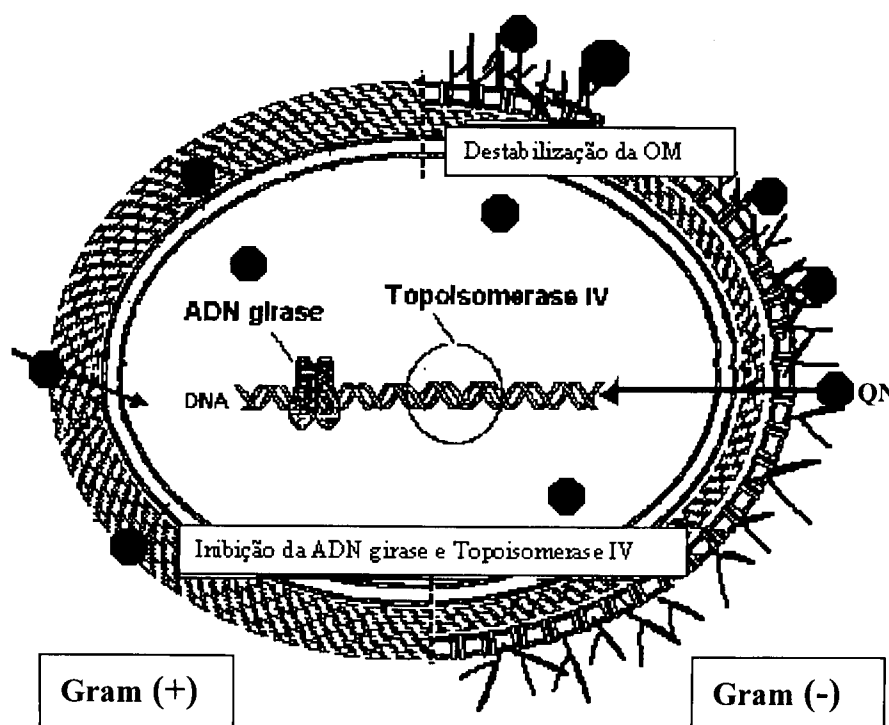


Figura I-5: Representação esquemática do mecanismo de acção das quinolonas nas células bacterianas de Gram positivo e de Gram negativo.

O DNA apresenta-se como uma estrutura dinâmica que pode ser dobrada, enrolada e mesmo torcida, adoptando diferentes formas helicoidais de acordo com a fase do ciclo celular em que a célula se encontrar. Este superenrolamento do DNA é de grande

importância biológica pois numerosos processos bioquímicos essenciais à subsistência da célula têm o seu desencadear dependente do grau de enrolamento em que o DNA se encontre. Nas bactérias, o grau de enrolamento resulta de um balanço das acções de superenrolamento e relaxamento levadas a cabo por enzimas diferentes: a DNA girase, que induz o superenrolamento negativo, e a topoisomerase IV, que o remove. Desta forma, as quinolonas ao bloquearem a acção destas enzimas, bloqueiam todos os processos que envolvam a separação das cadeias de DNA, tais como a replicação e a transcrição, induzindo-se alterações dos processos biológicos que são incompatíveis com a vida da célula bacteriana ⁽¹³⁾.

O acesso das quinolonas ao seu alvo de acção é um dos passos essenciais para o desenvolvimento da sua actividade antibacteriana. Nas bactérias Gram (-), a membrana externa constitui uma importante barreira à permeabilidade destas bactérias às quinolonas. Contudo, diversos estudos ^(14,15) apontam para uma entrada destes fármacos na célula bacteriana através de canais formados por proteínas transmembranares: as porinas. Pensa-se serem as porinas OmpF e OmpC as principais zonas de entrada das quinolonas pois tem-se verificado que as bactérias portadoras de mutações que afectem essas porinas apresentam um aumento da resistência às quinolonas ⁽¹⁶⁾. Para além da entrada através das porinas, e de acordo com a sua maior ou menor hidrofobicidade, as quinolonas são também associadas a outras vias de permeação celular adicionais à via porínica.

Conforme se referiu anteriormente, o núcleo base das quinolonas (ver Figura I-1), apresenta dois grupos carbonilo adjacentes nas posições 3 e 4, que formam um local de potencial quelatação de catiões bivalentes. Assim, se tivermos em conta que a membrana externa das bactérias Gram (-) apresenta-se revestida externamente por lipopolissacarídeos (LPS) cujos grupos polifosfatos adjacentes estão complexados por iões magnésio que mantêm estável e compacta a estrutura, facilmente nos apercebemos que a presença das quinolonas terá uma segunda acção destabilizadora ao complexar (recorrendo aos seus grupos carbonilo adjacentes) o magnésio presente nos LPS (Figura I-5). Ou seja, as quinolonas ao actuarem com a membrana externa como agentes quelantes, provocam uma deslocação do magnésio ligado, destabilizando a estrutura e consequentemente expondo domínios hidrofóbicos da membrana externa, através dos quais penetram na célula ⁽¹⁷⁾.

Relativamente, aos mecanismos de resistência desenvolvidos pelas bactérias contra a acção das quinolonas, estes podem dividir-se em dois grupos:

- 1 – Alterações nas enzimas alvo, DNA girase e topoisomerase IV;
- 2 – Alterações da acumulação intracelular devidas a:

- a) Diminuição da permeabilidade da membrana externa ao fármaco, devido a alteração nas porinas;
- b) Efluxo, por transporte activo.

O aparecimento de estirpes bacterianas resistentes às fluoroquinolonas mais antigas levou ao desenvolvimento de novas fluoroquinolonas com espectros de acção mais alargados e que constituem alternativas válidas para o tratamento de infecções por estirpes resistentes. Tal como já se referiu, é provável que o reforço da actividade antibacteriana das novas quinolonas esteja relacionado com as novas propriedades físico-químicas que estas apresentam. Porém, estas novas propriedades não parecem favorecer grandemente a sua lipofilia nem aumentar grandemente a afinidade para os seus alvos de acção, mas antes relacionam-se com uma maior capacidade de atravessar as membranas bacterianas, podendo o esclarecimento de dúvidas quanto a pormenores do mecanismo de acção, advir do esclarecimento de todas as interacções que ocorrem entre o fármaco e os diferentes constituintes membranares. Assim, o estudo do mecanismo de acção das fluoroquinolonas passa, em parte, pelos domínios da membranologia, particularmente, no que se refere à natureza das interacções entre estes fármacos e os principais intervenientes na sua entrada na célula bacteriana: componente lipídica e porínica.

1.4 Importância do estudo da interacção das quinolonas com modelos membranares

Como se salientou anteriormente, a passagem das fluoroquinolonas através das membranas bacterianas até ao seu local de acção é um passo essencial para que se verifique actividade antibacteriana. Assim, a utilização de modelos membranares, como lipossomas ou proteolipossomas, de estrutura e composição perfeitamente manipuláveis e de características bastante similares às membranas celulares, constitui uma importante ferramenta no esclarecimento do mecanismo de entrada das quinolonas na célula bacteriana.

Existe uma falha de informação no que concerne ao mecanismo molecular e cinética de entrada das quinolonas na célula bacteriana, sendo actualmente propostas três principais vias de entrada na célula bacteriana: a via hidrofóbica, por difusão através da bicamada lipídica; a via hidrofílica, por difusão pelo interior dos canais hidrofílicos das porinas; e a entrada com recurso ao aproveitamento da interface lípido/proteína. É sobre as diferentes possibilidades de permeação membranares das quinolonas que recaíram os estudos efectuados durante os trabalhos experimentais realizados tendo-se iniciado a abordagem

através da determinação da interacção com uma possível componente lipídica (estudos de partição e localização membranar da moxifloxacina), tendo-se, posteriormente, centralizado o estudo no contributo da componente porínica no acesso destes antibióticos aos seus alvos de acção.

2. Estrutura Bacteriana

2.1 Organização estrutural das bactérias

As bactérias, microorganismos procarióticos, têm uma organização celular bastante simples, podendo porém apresentar diversas morfologias e dimensões as quais puderam variar desde os 100-200 nm de diâmetro para o género *Mycoplasma* e os 1,1-1,5 µm para as células de *E. coli*⁽¹³⁾.

Na sua grande maioria as bactérias compõem-se de um número reduzido de estruturas intracitoplasmáticas essenciais ao seu metabolismo e divisão celular, de entre as quais se destaca o seu material genético, protegidas do meio externo por uma série de invólucros membranares responsáveis pela protecção do meio intracelular das agressões e adversidades do meio extracelular.

Toda a informação genética bacteriana está inscrita numa única molécula circular de DNA, que na ausência de núcleo ou verdadeiros cromossomas se localiza, sob a forma compactada, no citoplasma bacteriano⁽¹⁸⁾. A dimensão desta molécula de DNA distendida ultrapassa largamente as dimensões bacterianas o que implica que o DNA esteja compactado e enrolado sobre si mesmo de modo a caber dentro da célula. Sempre que haja necessidade de replicação do DNA, vão-se desenvolvendo tensões provocadas pelo desenrolamento das cadeias que são continuamente aliviadas pela acção das topoisomerases, enzimas essenciais para a sobrevivência da célula bacteriana⁽¹³⁾.

Todas as bactérias, à excepção do *Mycoplasma*, formas L e halófilos possuem parede celular, pois de um modo geral o seu desenvolvimento acontece em ambientes hipotónicos o que, dada a fragilidade da membrana citoplasmática, levaria à lise celular se não existisse uma parede celular rígida. Esta estrutura representa assim uma protecção mecânica eficaz contra a rotura osmótica da célula bacteriana e adicionalmente, uma vez que é estruturada sob controlo genético, é responsável pela morfologia bacteriana. A parede celular é ainda responsável pelo duplo comportamento das bactérias relativamente à coloração de Gram, coloração de relevante importância taxionómica. O diferente comportamento das bactérias relativamente à coloração de Gram prende-se com a diferente composição química e organização estrutural da sua parede celular, repercutindo-se em diferenças ultraestruturais entre os dois grupos bacterianos evidenciados por microscopia electrónica de transmissão (Figura I-6).

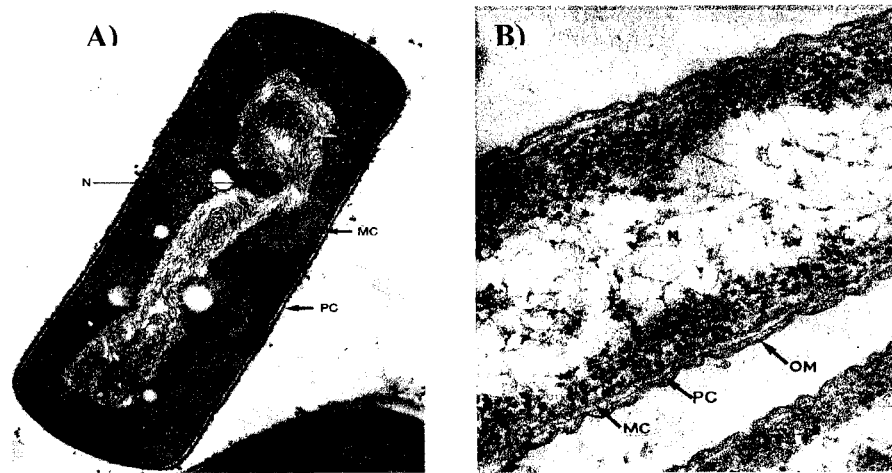


Figura I-6: Fotografias de microscopia electrónica de transmissão das células de *B. cereus* (A), bactéria de Gram (+), e *E. coli* (B), bactéria de Gram (-), fixadas com tetróxido de ósmio. MC - Membrana citoplasmática; PC- Parede celular; OM - Membrana externa. Imagem adaptada da referência [13].

Na parede celular das bactérias de Gram (+), além do peptidoglicano, principal constituinte da parede celular, existem outros heteropolímeros como os ácidos teicóicos e os ácidos teicurónicos, que se encontram firmemente associados ao peptidoglicano e que embora não contribuam para a rigidez desta estrutura, são responsáveis pela carga negativa caracteristicamente presente na superfície nas bactérias Gram (+), sendo, portanto, responsáveis pela mobilização de iões bivalentes (Ca^{2+} ou Mg^{2+}) que contribuem para um maior estabilidade da parede celular destas bactérias. Relativamente à parede celular das bactérias de Gram (-), para além do peptidoglicano (constituinte universal dos procariotas), outras importantes macromoléculas participam na sua composição: lipopolissacarídeos (LPS), fosfolípidos e proteínas. Assim, a parede celular das bactérias de Gram (-) revela a existência de duas camadas, uma camada rígida essencialmente composta de peptidoglicano e uma membrana exterior, com um perfil laminar assimétrico (Figura I-7).

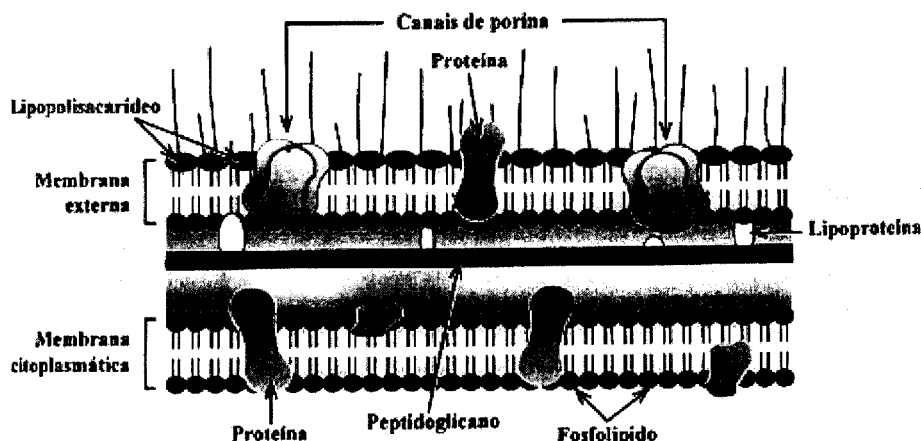


Figura I-7: Esquema da arquitectura molecular da parede celular das bactérias de Gram (-). Adaptado da referência [13].

2.2 Membrana Externa

As bactérias de Gram (-) constituem a maioria no mundo bacteriano, sendo o seu sucesso evolutivo frequentemente associado à presença de uma membrana externa que envolve a membrana citoplasmática e a camada de peptidoglicano. Esta membrana externa tem funções de protecção da célula bacteriana de agentes agressores externos, tais como enzimas, detergentes e muitos antibióticos, e por isso tem profunda influência na fisiologia da bactéria ⁽¹⁹⁾.

A membrana externa apresenta-se com uma estrutura marcada por uma acentuada assimetria, com um folheto interno constituído essencialmente por fosfolípidos (70-80 % fosfatidiletanolamina, 20-30 % fosfatidilglicerol e cardiolipina) e apresentando um folheto externo constituído essencialmente por um glicolípido complexo normalmente designado de LPS (lipopolisacarídeo) ⁽¹⁹⁾. O LPS constitui a molécula mais característica das bactérias de Gram (-) e a principal endotoxina bacteriana, sendo actualmente responsabilizado pelas principais manifestações clínicas decorrentes de uma infecção grave por bacilos Gram negativos. Esta molécula anfifílica compõe-se de uma região polissacarídea (hidrófila), que se projecta para o exterior da célula e é responsável pela carga electronegativa da superfície bacteriana; e pelo lípido A (região hidrófoba) responsável pela ancoragem do LPS na membrana externa. A presença de uma estrutura volumosa e rígida como o lípido A e as interacções estabelecidas entre moléculas de LPS adjacentes, através de ligações divalentes envolvendo catiões, contribui para uma acentuada redução da fluidez do folheto externo desta membrana, tornando-a uma barreira eficaz contra a penetração de antibióticos, detergentes e outros agentes nocivos à bactéria. A quelatação dos iões divalentes envolvidos na estabilização da membrana externa resulta na libertação do LPS, o que torna a membrana externa muito mais permeável a compostos hidrofóbicos, tornando a célula bacteriana muito mais vulnerável ⁽¹³⁾.

Para além da componente lipídica, é também parte integrante da composição desta membrana, uma forte componente proteica. Cerca de 50 % do peso total da membrana externa provém da presença de diferentes grupos de proteínas estrutural e funcionalmente distintas ^(20,21), das quais são exemplos as lipoproteínas, as porinas, as proteínas envolvidas na difusão específica e selectiva de compostos e algumas enzimas. Deste conjunto de proteínas, destaca-se apenas o grupo designado de porinas, pois dele constitui exemplo a proteína OmpF, ponto essencial do objecto de estudo desta dissertação.

Sob a designação de porinas enquadra-se o grupo de proteínas transmembranares que se organizam em poros ou canais hidrofílicos na membrana externa e cuja presença

permite, de modo mais ou menos específico, a difusão de solutos (dentro de determinados limites de massa molecular) através da membrana ⁽²⁰⁾. As porinas são o grupo de proteínas mais abundante da membrana externa, existindo normalmente cerca de 10^5 porinas por cada bactéria Gram negativa. Estas proteínas têm, habitualmente, uma disposição sob a forma de arranjos hexagonais, que se repetem à distância de 7,7 nm sendo cada unidade deste arranjo um trímero. As massas moleculares das porinas estão, normalmente, compreendidos entre 32 000 – 40 000 daltons (OmpF, monómero, apresenta uma massa molecular de 37 000 daltons) ^(13, 22). Este grupo de proteínas membranares apresenta elevada homologia estrutural (OmpF e PhoE compartilham 63 % da sua estrutura primária), o que justifica a sua semelhança estrutural e algumas das suas características, contudo, é ao nível das suas propriedades de permeação de solutos que demonstram as principais diferenças ⁽²³⁾.

Genericamente, e de acordo com a sua maior ou menor especificidade de substrato, são divididas em dois grandes grupos, as porinas não específicas ou gerais, que permitem a difusão de diversos tipos de substratos sem grande especificidade (embora demonstrem alguma especificidade por catiões ou aniões como acontece respectivamente com OmpF e PhoE, e as porinas ditas selectivas pois formam canais que permitem apenas a difusão de substratos específicos (caso da LamB que é específica para a difusão de açúcares e de Tsx que é específica para nucleosídeos) ^(24, 25).

A proteína introduzida no sistema em estudo, a OmpF, pertence ao grupo das porinas ditas de não específicas ou gerais permitindo, de um modo geral, a passagem de substratos com tamanhos não superiores a 600 Da e, como já se referiu, preferencialmente na forma catiónica ^(23, 26, 27).

2.3 Proteína F da Membrana Externa Bacteriana: OmpF

2.3.1 Caracterização estrutural

A porina OmpF apresenta-se, quando disposta na sua conformação activa, sob a forma estrutural de trímero (homotrímero). Cada um dos seus monómeros é constituído por uma longa cadeia polipeptídica com 340 aminoácidos que se reorganizam numa conformação em β -camada constituída por 16 cadeias antiparalelas distendidas transversalmente ao longo de toda a membrana, com os terminais amino e carboxílico ligados por ponte salina, formando-se assim largos canais transmembranares delineados por uma estrutura em camada β e com uma orientação perpendicular ao plano da membrana (Figura I-8). Ou

seja, pode dizer-se que o trímero que constitui OmpF forma um canal através da membrana com três aberturas voltadas para a superfície exterior da célula bacteriana (Figura I-8 B) ^(21, 23, 28)

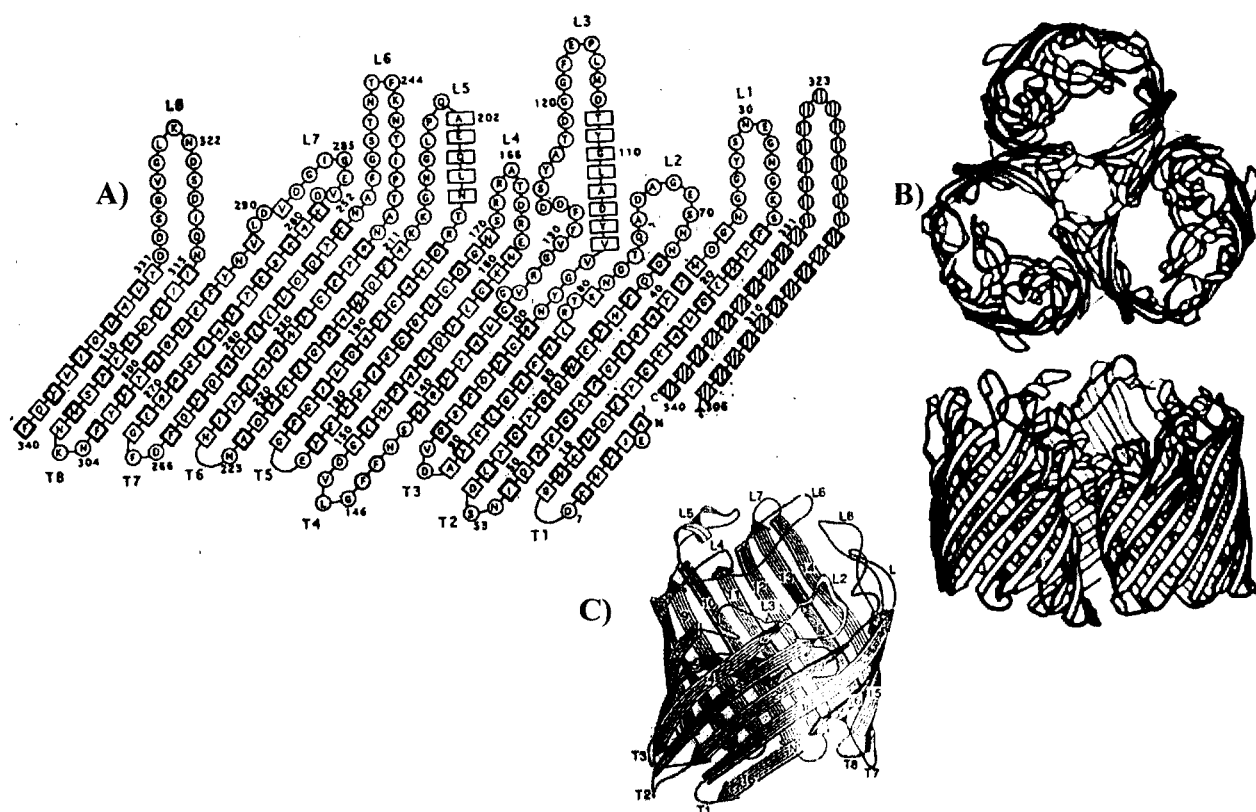


Figura I-8: Representações esquemáticas da estrutura de OmpF. A) Sequência de aminoácidos (em código de letras) e disposição membranar em camada β , que constitui a estrutura secundária, na forma distendida; B) Organização da estrutura quaternária sob a forma de trímero, vista de topo da membrana (em cima) e visto ao nível do plano da membrana (em baixo); C) Organização estrutural do monômero (estrutura terciária da proteína) no plano membranar. As designações L e T que surgem nas imagens A) e C) referem-se, respectivamente, às ansas exteriores e às periplasmáticas. Imagens adaptadas da referência [23].

Em média, a espessura de uma membrana não ultrapassa os 5 a 6 nm sendo necessários apenas 10 aminoácidos para a atravessar. Assim, uma cadeia polipeptídica com 340 aminoácidos, como a que apresenta o monômero de OmpF, atravessaria a membrana pelo menos 25 vezes, porém, a análise detalhada da estrutura da porina revela que esta atravessa apenas 16 vezes pois uma parte considerável da sua sequência primária é exposta, sob a forma de longas ansas, na superfície membranar (Figura I-8) ^(23, 24). Isto é, parte da estrutura que compõe o monômero de OmpF dispõe-se sob a forma de ansas que constituem os pontos de inflexão da sua estrutura secundária, apresentando cada monômero um total de 16 ansas, oito ansas curtas voltadas para o espaço periplásmico (T_1 a T_8) e oito ansas de maiores dimensões (L_1 a L_8) voltadas para o espaço extracelular e

constituindo uma superfície de características bastante irregulares ⁽²³⁾. Das oito ansas voltadas para a superfície extracelular, são reconhecidas funções específicas à ansa número 2 ou L₂, envolvida no estabelecimento de interacções entre monómeros adjacentes, e à ansa número 3 ou L₃ de maiores dimensões e mais proeminente e que ao contrário das restantes ansas não se expõe à superfície celular mas antes dobra-se para o interior do canal, formando uma zona de constrição, sensivelmente, a meia altura do canal ^(23, 26, 29). Consequência desta disposição estrutural, a porina OmpF apresenta-se com uma forma aproximadamente “bicónica”, com dimensões de poro que variam desde os 11 × 19 Å na superfície extracelular, 7 × 11 Å na zona de constrição formada por L₃ e por último 22 × 15 Å na extremidade periplásmica ^(23, 26, 30).

A principal contribuição para a formação do trímero que constitui a estrutura quaternária de OmpF é de origem hidrofóbica, com a interface dos monómeros a apresentar forte compactação dos grupos volumosos que a compõe, existindo uma distância de separação entre os monómeros de ~35 Å ⁽²³⁾.

2.3.2 Selectividade iónica

Apesar de não apresentar elevada selectividade quanto ao tipo de soluto que permeia o canal hidrofílico que constitui cada um dos seus monómeros, a porina OmpF impõe algumas restrições a essa permeação em consequência da sua organização estrutural. Assim, é a combinação do espaço interno do canal, adicionada do seu potencial electrostático que vai imprimir alguma restrição quer no que respeita às dimensões das moléculas que permeiam a porina (inferiores a ~600 Da), quer no que respeita o seu carácter iónico (selectividade catiónica) e mesmo o carácter hidrofílico necessário (compostos de elevada hidrofobicidade são excluídos desta via de permeação) ^(23, 26, 27, 31).

Estudos efectuados com OmpF ^(23, 32, 33) têm demonstrado que a modificação na composição dos aminoácidos carregados do interior do canal desencadeia alterações na selectividade do canal. Observações deste tipo, permitiram concluir que a zona de constrição do canal apresenta características electrostáticas específicas para cada porina que lhe definem o tipo de selectividade a demonstrar. Ou seja, a relativa selectividade de OmpF por catiões, parece estar associada à presença de aminoácidos carregados negativamente no interior ou próximos da abertura do canal ^(23, 24, 33).

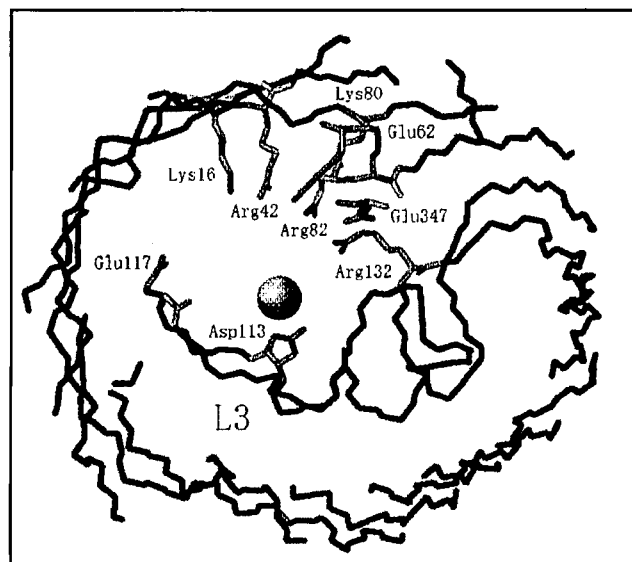


Figura I-9: Zona de constrição da porina OmpF (vista perpendicular à direcção da membrana). As cadeias laterais dos aminoácidos carregados da zona de constrição estão representadas a cinzento. A esfera ao centro representa um contra-íon ligado ao aminoácido Asp113 (Ácido aspártico, carregado negativamente). Na figura pode ainda ver-se o grupo de aminoácidos catiónicos (Arg-42, Arg-82, Arg-132, Lys-16) e os dois resíduos laterais com grupo carboxílico (Asp-113 e Glu-117) da ansa L3, cuja presença constitui o principal contributo para o forte campo electromagnético da constrição. Adaptado da referência [34].

Na zona de constrição formada pela ansa L₃ a abundância de aminoácidos carregados positivamente proporciona o estabelecimento de fortes interações com os resíduos negativos de L₃ (Figura I-9) estabelecendo-se assim um forte campo electrostático de orientação paralela ao plano membranar. O tamanho e distribuição das cargas eléctricas desta zona, mais a abundância de cargas negativas da superfície exterior do canal, definem as características de permeabilidade do canal no que respeita ao carácter iónico das moléculas que através dele se difundem.

2.3.3 Caracterização físico – química: estabilidade, solubilidade e características espectroscópicas

No contexto do trabalho experimental realizado, torna-se importante salientar algumas características destas proteínas membranares pois as mesmas justificam algumas das condições experimentais utilizadas.

As porinas, graças ao tipo de estrutura secundária que apresentam têm em comum determinadas características físico-químicas, como sejam, o seu comportamento em solução aquosa e a sua acentuada estabilidade.

Os trímeros que constituem a porina OmpF demonstram grande estabilidade resistindo a temperaturas elevadas, à presença de detergentes com propriedades desnaturantes (mantém-

se estável mesmo quando aquecida em 2 % SDS a 70 °C), à acção de proteases e mantendo-se estável dentro de um largo intervalo de pH ^(29, 35, 36, 37). Este tipo de comportamento constitui uma característica essencial à subsistência da célula bacteriana já que é tolerante às condições adversas do trato gastrointestinal do hospedeiro ⁽²³⁾.

A conformação em β -camada dispõe os aminoácidos da cadeia polipeptídica em cadeias dispostas lado a lado e ligadas entre si através de pontes de hidrogénio cruzadas. Todas as ligações peptídicas participam dessa ligação cruzada e produzem assim grande estabilidade na estrutura. Adicionalmente, no caso específico de OmpF, a estabilidade da estrutura (trímero) é ainda assegurada por uma rede de pontes de hidrogénio estabelecidas entre a ansa L₃ e a parede do canal, bem como pelas interacções polares e iónicas, entre monómeros, estabelecidas pela ansa L₂, cuja disposição permite o contacto com a subunidade vizinha ⁽²⁹⁾.

Como se referiu anteriormente, a OmpF dispõe-se na membrana externa sob a forma de canal hidrófilo perfeitamente delimitado por uma estrutura em camada β , constituída na sua zona membranar por número igual de aminoácidos com características hidrofílicas e hidrofóbicas (consequência do tipo de estrutura secundária, existe igual número de aminoácidos voltados para os lípidos da membrana e para o interior do canal). Porém, como a estrutura apresenta longas porções de cadeia polipeptídica em ambiente exterior à membrana, e portanto de constituição essencialmente hidrofílica, o balanço entre os aminoácidos com características hidrofílicas e aqueles com características hidrofóbicas acaba por tender para a hidrofília. Na realidade, da comparação de todos os tipos de proteínas presentes no invólucro celular das bactérias de Gram negativo, denota-se que as porinas são ainda mais hidrofílicas que as proteínas do espaço periplasmático ⁽²³⁾.

No que concerne a propriedades espectroscópicas, ainda que nenhum dos aminoácidos encontrados nas proteínas absorva luz na faixa do visível, existem três aminoácidos – tirosina (Tyr), triptofano (Trp), e fenilalanina (Phe) – que absorvem significativamente a luz no ultravioleta. Uma vez que a maioria das proteínas apresenta estes aminoácidos na sua composição, as características de absorção da proteína são sempre o resultado da conjugação da absorção de cada um destes constituintes com o tipo de estrutura que a proteína apresenta e consequente micro ambiente a que expõe cada um destes aminoácidos.

A presença dos três aminoácidos, acima referidos, confere às proteínas uma fluorescência intrínseca que lhes é característica e que é o resultado da mistura da fluorescência individual de cada um destes aminoácidos. Porém, e graças às características intrínsecas de cada um dos aminoácidos, grande parte da fluorescência emitida pelas

proteínas é resultante da excitação dos resíduos de triptofano sendo as emissões da tirosina e a fenilalanina um contributo secundário.

Relativamente, à fluorescência de OmpF, cada monómero que constitui a porina tem na sua constituição dois triptofanos, nas posições 61 e 214. O Trp²¹⁴ está localizado na interface lípido proteína, enquanto que o Trp⁶¹ tem localização na interface do trímero (está voltado para o centro do canal). Estudos efectuados com mutantes de OmpF⁽³⁸⁾, nas quais se substituiu selectivamente um ou outro dos resíduos de Trp, mostraram que o espectro de emissão do Trp⁶¹ ocorre a comprimentos de onda ligeiramente inferiores àqueles obtidos para o Trp²¹⁴. Como os comprimentos de onda de emissão do Trp tendem a diminuir com a diminuição da polaridade do meio envolvente⁽³⁹⁾, isto sugere que o Trp⁶¹ na interface do trímero está num ambiente predominantemente hidrofóbico⁽³⁸⁾.

Apesar da existência de um número considerável de tirosinas na estrutura (existem 29 resíduos de tirosina por monómero) a fluorescência de OmpF reflecte predominantemente a contribuição dos triptofanos^(38, 40).

3. Sistemas Miméticos de Membranas Biológicas

O estudo de membranas biológicas e de sistemas modelo de membranas ocupa lugar de destaque na investigação bioquímica e biofísica. Às biomembranas são atribuídas funções tão importantes como a definição dos limites da célula e de inúmeros organitos celulares, de controlo de todo o tipo de interacções entre o meio interno e o exterior e ainda, ao nível bioquímico, grande parte dos processos celulares ocorre em membranas ou envolvem a membrana em determinado ponto do processo.

Apesar de existir uma enorme variedade de seres vivos de tipos de células e de organitos, é actualmente aceite que a unidade estrutural básica de todas as biomembranas é a bicamada lipídica. Paralelamente à grande diversidade de lípidos que podem integrar a composição das membranas biológicas, os principais constituintes das membranas são proteínas (seu conteúdo proteico pode variar entre 20-80 %), que são as responsáveis pela sua actividade bioquímica. Adicionalmente, algumas membranas podem ainda ter glícidos, que, contudo, estão presentes sempre na forma de glicolípidos ou glicoproteínas (Tabela I-2).

Membrana	Razão mássica Lípido/Proteína	Lípidos principais
Mielina (Humana)	3-4	PC 10%; PE 20 %; PS 8,5%; SM 8,5 %; Col 27 %;
Eritrócito (Humano)	0,75	PC 25%; PE 22 %; PS 10%; SM 18 %; Col 25 %;
Retículo Sarcoplasmático	0,66-0,70	PC 66%; PE 12,6 %; PI 8,1%; Col 10%;
<i>E. coli</i> (Membrana Citoplasmática)	0,4	PE 70-80 %; PG e cardiolipina 20-30%; Sem Col;
<i>E. coli</i> (Membrana Externa)	0,3-0,4	PE 35-40 %; PG e cardiolipina 10-15%; Glicolípido (LPS) ~50%; Sem Col;

Tabela I-2: Composição de algumas membranas celulares animais e de bactérias. As abreviaturas usadas têm o seguinte significado: PC-fosfatidilcolina; PE-fosfatidiletanolamina; PG-fosfatidilglicerol; PI-fosfatidilinositol; Col-colesterol; SM-esfingomielina. Valores da tabela obtidos das referências [13] e [41].

Uma vez que as membranas biológicas constituem sistemas multifuncionais bastante complexos, torna-se óbvia a necessidade de entender a organização e funcionalidade de cada um dos seus componentes de forma a se poder explicar as propriedades de determinada biomembrana e o tipo de interacção que desenvolve com os compostos que

com ela se deparam. Neste contexto, os estudos em sistemas modelo de biomembranas têm grande utilidade, pois constituem uma simplificação dos parâmetros a investigar com a possibilidade de controlo de algumas das inúmeras variáveis que uma membrana biológica apresenta.

Desde há quase um século, que as monocamadas lipídicas numa interface ar/água têm sido utilizadas para a determinação de alguns parâmetros membranares. As moléculas de lípido são adsorvidas na interface ar/água, daí resultando um filme de uma molécula de lípido de espessura em que a zona polar se encontra em contacto com a água e as caudas hidrófobas se estendem na direcção oposta ⁽⁴¹⁾. Os sistemas de monocamadas lipídicas constituem sistemas bem definidos e adequados ao estudo de interacções moleculares entre lípidos e entre lípidos e proteínas não integrais, mas dada a sua excessiva simplificação do sistema membranar são de utilização limitada.

Outro tipo de sistemas modelo de membranas são as bicamadas planares, que podem ser preparadas colocando uma solução de fosfolípido num solvente hidrófobo num orifício de um suporte apolar (tema a desenvolver no item 4.4) que separa dois compartimentos contendo soluções aquosas. Esta técnica de preparação, que pode ser usada no estudo de proteínas, como canais iónicos, tem contudo a desvantagem de as bicamadas poderem não ser estáveis e/ou conter uma quantidade residual de solvente ⁽⁴¹⁾.

Um outro tipo de estrutura utilizada, por exemplo, para especular sobre o tipo de interacção desenvolvido entre determinado composto e a membrana, é a micela. Este tipo de estrutura formado por agregação de agentes anfífilicos em concentrações acima da sua concentração micelar crítica, é composto por uma superfície hidrofílica e um centro hidrofóbico constituindo, assim, modelos extremamente simplificados com apenas dois compartimentos e que pecam como modelos membranares pela reduzida semelhança estrutural com os sistemas que pretendem mimetizar ⁽⁴²⁾.

Os sistemas modelo de biomembranas mais populares, graças à sua versatilidade e semelhança estrutural, são os lipossomas. Estas vesículas esféricas apresentam-se com diâmetros compreendidos entre alguns nanómetros e alguns micrómetros e são constituídas basicamente por fosfolípidos naturais ou sintéticos, podendo também incluir outros componentes membranares, tais como colesterol, glicolípidos ou mesmo proteínas, consoante o estudo a desenvolver ou a membrana a mimetizar ⁽⁴³⁾. A utilização dos lipossomas nas mais diversas áreas de investigação tem vindo a expandir-se de forma notável, desde os trabalhos pioneiros de Bangham (quem pela primeira vez descreveu a sua formação em 1965), e que centrou a sua utilização como modelos membranares em estudos

bioquímicos e biofísicos, até à sua actual importância ao nível da farmacologia como vectores de fármacos, são inúmeros os estudos envolvendo lipossomas⁽⁴⁴⁻⁴⁷⁾.

3.1 Anfipatia e formação de agregados supramoleculares

Moléculas anfipáticas ou anfifílicas são moléculas em que entidades químicas possuidoras de afinidade ou repulsa pela água coexistem. Assim, a mesma molécula apresenta em áreas diferenciadas um grupo polar, vulgarmente designado de “cabeça polar”, e um grupo apolar designado por “cauda”^(42, 48).

A cabeça polar das moléculas anfipáticas, ou mais especificamente a carga eléctrica a ela associada, determina grande parte das propriedades físico-químicas destas moléculas, constituindo a base da classificação mais usual dos agentes anfifílicos, que se dividem em aniónicos, catiónicos, não iónicos e bipolares^(42, 48).

É a necessidade de satisfazer as características antagónicas das zonas moleculares que as compõe, e desta forma minimizar a energia do sistema, que origina a junção dos resíduos hidrofóbicos, formando-se diversos tipos de agregados como micelas, monocamadas, bicamadas e estruturas vesiculares, e mesmo à existência da membrana biológica⁽⁴⁸⁾. Quando em presença de um excesso de água (ou de um outro solvente) os compostos anfifílicos auto agregam-se formando diferentes tipos de estruturas organizadas (Figura I-10). Estas estruturas apresentam uma região externa com características idênticas à do solvente e uma região interna de propriedades inversas da anterior.

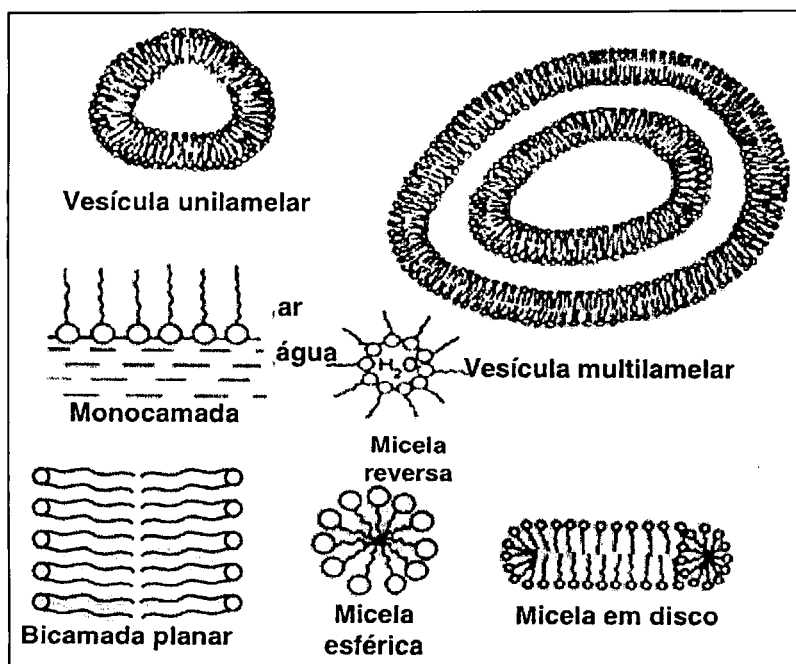


Figura I-10: Representação esquemática das principais estruturas organizadas formadas por agentes anfifílicos. Adaptado da referência [49].

Esta agregação dos agentes anfifílicos num dado solvente desencadeia a formação dos mais variados tipos de estrutura, consequência directa da contribuição relativa das regiões

hidrofóbicas e hidrofílicas da molécula, ou seja, o tipo e forma do agregado formado depende da constituição molecular do agente anfifílico o que facilmente se justifica através de simples considerações geométricas.

Forma crítica de empacotamento	Estruturas formadas
Cone	Micelas esféricas
Cone truncado	Micelas globulares / cilíndricas
Cone truncado	Bicamadas flexíveis Vesículas
Cilindro	Bicamadas planas
Cone truncado invertido	Micelas invertidas

Figura I-11: Formas moleculares dos agentes anfifílicos e respectivas estruturas de agregação. Adaptado da referência [50].

Agentes anfifílicos cujas moléculas sejam constituídas por duas cadeias hidrocarbonadas longas tendem a formar bicamadas, enquanto que moléculas com uma só cadeia, ou duas cadeias curtas (menos de 8 C) formam micelas. A formação de micelas ou bicamadas pode, de um modo geral, ser relacionada com a ocupação espacial relativa dos grupos polares e apolares das moléculas anfifílicas. Ou seja, quando a molécula anfifílica se apresenta com uma configuração cônica, apresentando uma área polar elevada e uma “cauda” única, tende a formar micelas esféricas. Se a área polar diminuir relativamente à cauda o agregado formado assumirá a forma de micelas globulares ou cilíndricas. Adicionalmente, a existência de duas cadeias hidrocarbonadas longas e fluidas leva à

formação de vesículas de bicamadas flexíveis, enquanto que moléculas anfifílicas com duas cadeias mas com menor fluidez e configuração cilíndrica formam bicamadas planas. Os agentes anfifílicos com dupla cauda mas com baixos valores de área polar tendem a formar micelas invertidas (Figura I-11) ^(43, 51).

3.2 Lipossomas

Sob a designação de lipossomas compreendem-se as estruturas esféricas e fechadas (vesículas), compostas por agentes anfifílicos agregados em bicamada, e que encerram no seu interior um determinado volume de solução aquosa que constitui um compartimento interno de características polares. Os lipossomas são constituídos basicamente por fosfolípidos naturais ou sintéticos, podendo ainda incluir na sua composição outros componentes membranares tais como proteínas ou colesterol ⁽⁴³⁾.

A estrutura dos lipossomas caracteriza-se, essencialmente, pela existência de bicamadas lipídicas, formando vesículas mono ou plurimembranares, que se apresentam com diâmetros compreendidos entre alguns nanómetros e alguns micrómetros. Contudo, este tipo de agregado apresenta grande diversidade estrutural e morfológica característica múltiplas vezes evidenciada pela microscopia electrónica e que originou uma classificação cujo principal critério assenta no número de bicamadas existentes e na dimensão das vesículas.

A dispersão de fosfolípidos em excesso de água, sem qualquer processamento adicional origina uma população polidispersa de vesículas multilamelares denominadas de MLV (MLV-“multilamellar vesicles”) cujos tamanhos estão geralmente compreendidos entre 0,4 e 3,5 μm . Nesta situação, cada vesícula consiste em várias lamelas lipídicas concêntricas, que subdividem o compartimento aquoso interno em várias fracções de meio aquoso (Figura I-12) ⁽⁵²⁾. Os MLV quando em comparação com outros tipos de lipossomas apresentam um volume aquoso interno mediano (1-4 l/mol de lípido) e uma elevada capacidade de encapsulação de fármacos lipofílicos ⁽⁵³⁾. Contudo, este tipo de estrutura é frequentemente preterido como sistema modelo de membranas, pois desenvolveram-se diversas técnicas de preparação de vesículas unilamelares, de dimensões mais controláveis, e propriedades vantajosas. Por exemplo, em estudos fotofísicos, o uso de MLV é bastante limitado (principalmente se a baixos comprimentos de onda) devido à elevada dispersão de luz causada por estas estruturas.

As vesículas unilamelares costumam classificar-se atendendo às suas dimensões. Assim, chamam-se vesículas unilamelares pequenas (SUV-Small unilamellar vesicles”)

aquelas de diâmetro entre 25 e ~50 nm, e grandes (LUV- “large unilamellar vesicles”) aquelas com diâmetros superiores a 50 nm, que se apresentam geralmente com dimensões inferiores a 500 nm (Figura I-12) ⁽⁴⁸⁾. O pequeno tamanho dos SUV constitui, normalmente, um problema pois, por um lado, as vesículas demonstram-se instáveis relativamente à fusão, originando com o passar do tempo estruturas de maiores dimensões. Por outro lado, a sua elevada curvatura resulta em dificuldades de empacotamento. A área de superfície externa é aproximadamente dupla da interna, e cerca de 70 % das moléculas de lípido estão na monocamada externa, o que conseqüentemente origina duas monocamadas não equivalentes. Por todos estes motivos as LUV constituem um modelo superior de membranas biológicas ⁽⁴¹⁾. As LUV possuem um volume aquoso interno elevado (7 l/mol de lípido) em contraste com as SUV (0,2-5,1 l/mol de lípido), adicionalmente, têm também elevada capacidade de captação de macromoléculas ⁽⁵³⁾. São ainda bastante mais estáveis que as SUV possuindo maior deformabilidade, pois é aqui independente da curvatura da vesícula, bem como uma menor tensão membranar superficial ⁽⁵⁴⁾.

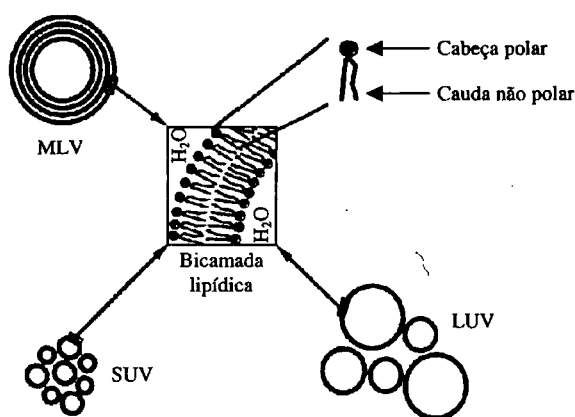


Figura I-12: Representação esquemática da estrutura de diferentes tipos de vesículas. Adaptado do sítio da Avanti Polar Lipids, www.avantilipids.com.

3.2.1 Estrutura, propriedades e configuração molecular dos fosfolípidos

Dada a sua importância como componentes das membranas celulares, os fosfolípidos constituem um dos exemplos mais relevantes de moléculas anfipáticas, denominando-se de fosfoglicerídeos ou esfingomielinas consoante derivem, respectivamente, do glicerol ou da esfingosina.

Os fosfoglicerídeos consistem numa parte central, constituída por glicerol, a qual se conjuga com uma parte hidrófila e uma parte hidrófoba. A parte hidrófila resulta da esterificação de um dos hidroxilos do glicerol, compondo-se de uma molécula de ácido

fosfórico (no caso do ácido fosfatídico) ou por um conjunto formado por ácido fosfórico e por uma molécula hidrossolúvel, esterificados entre si. Esta molécula hidrossolúvel contém, pelo menos, um grupo hidroxilo, sendo as mais comuns a colina, o glicerol, o inositol, a serina ou a etanolamina (Figura I-13), e é responsável pelo carácter eléctrico do fosfoglicerídeo que resultará electricamente neutro ou com carga negativa consoante a carga inerente aos respectivos radicais. Relativamente à parte hidrófoba, esta é formada por uma ou duas cadeias hidrocarbonadas de ácidos gordos saturados ou insaturados, que esterificam igual número de grupos hidroxilo do glicerol, apresentando cada uma entre 12 a 24 átomos de carbono ^(43, 54).

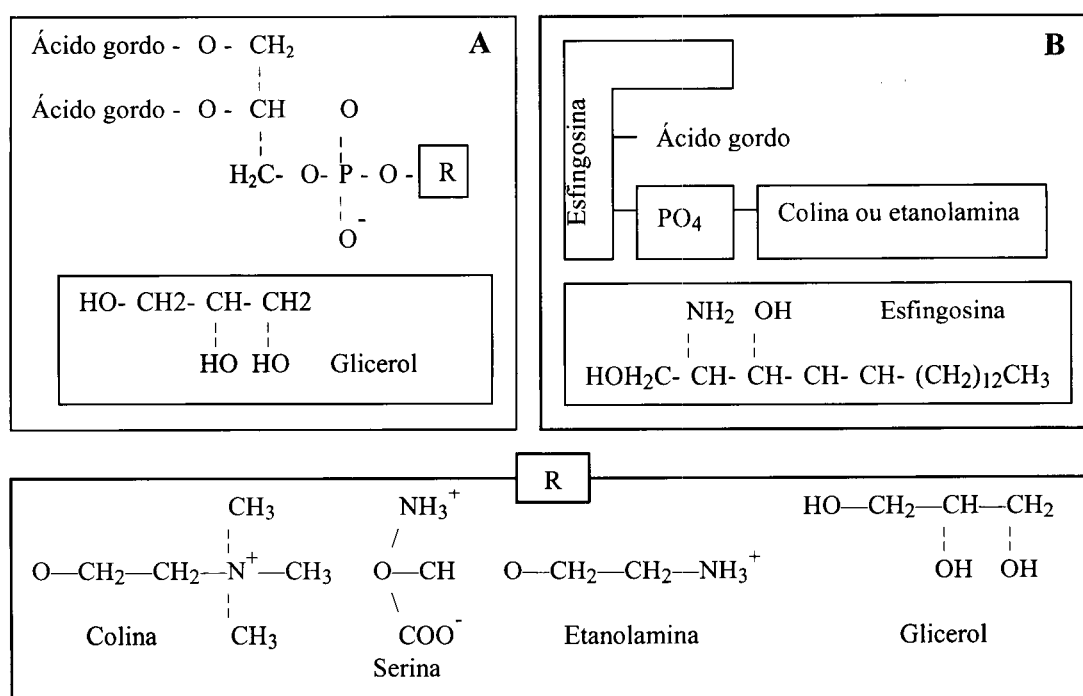


Figura I-13: Representação esquemática de um fosfoglicerídeo (A) e de um esfingolípido (B), bem como dos principais grupos polares (R) que a eles podem estar associados.

Os únicos fosfolípidos biomembranares que não derivam do glicerol são as esfingomielinas, que apresentam em seu lugar uma molécula de esfingosina (álcool aminado composto de uma longa cadeia hidrocarbonada insaturada). Nas esfingomielinas o grupo amina da esfingosina encontra-se ligado a um ácido gordo, através de uma ligação amida, enquanto que o grupo hidroxilo primário se apresenta esterificado na fosforilcolina ou na fosforetanolamina.

Os fosfolípidos contendo colina são os mais abundantes da natureza, apresentando-se sob a forma de iões dipolares a pH fisiológico com o grupo amónio quaternário dispondo

carga positiva e o grupo fosfato carga negativa ⁽⁴³⁾. Com a exceção da fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, os restantes fosfolípidos apresentam-se com carga negativa, o que justifica a carga superficial negativa que as membranas biológicas apresentam e que é essencial a numerosos processos fisiológicos.

No que respeita a sua origem, os fosfolípidos podem classificar-se como naturais ou de origem sintética. Os fosfolípidos de origem natural são extraídos de materiais biológicos, nomeadamente, as fosfatidilcolinas (vulgarmente designadas de lecitinas) são obtidas da soja ou da gema de ovo e a fosfatidilserina é obtida do cérebro bovino. Estes produtos de origem natural são, geralmente, bastante heterogêneos no que respeita as cadeias hidrocarbonadas dos ácidos gordos que os compõem, exibindo ainda um grau variável de insaturação. Relativamente aos fosfolípidos de origem sintética, como por exemplo a dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) ou o dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG) (Figura I-14), estes apresentam uma composição perfeitamente definida, particularmente no que concerne aos grupos acilo, podendo ser obtidos com cadeias hidrocarbonadas saturadas ou insaturadas, com maior ou menor número de átomos de carbono, iguais ou diferentes. Têm um comportamento facilmente caracterizável relativamente aos diversos parâmetros termodinâmicos, isto comparativamente com as populações heterogêneas constituintes dos fosfolípidos naturais ⁽⁵⁴⁾.

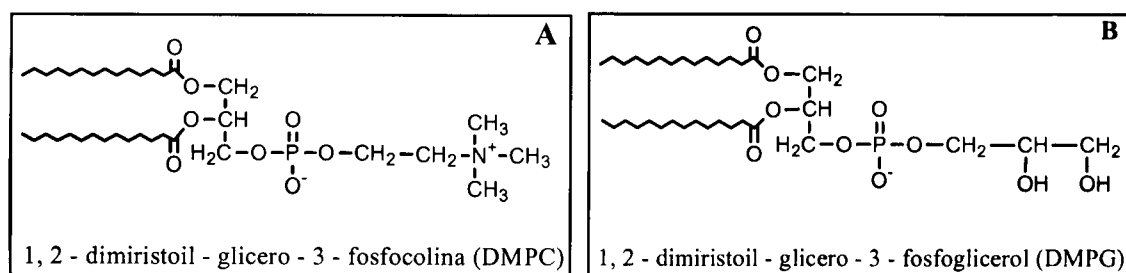


Figura I-14: Fórmulas estruturais de dois exemplos de fosfolípidos sintéticos (DMPC e DMPG).

Muitas das propriedades físicas das bicamadas membranares ou pseudo membranares (bicamadas dos modelos membranares), tais como estabilidade, permeabilidade ou temperatura de transição de fase (T_m), dependem do comprimento e grau de saturação dos ácidos gordos que compõem os fosfolípidos que as constituem ⁽⁵⁴⁾.

As bicamadas fosfolipídicas podem apresentar-se em duas fases termodinamicamente distintas, uma de grande ordenação, estado de gel e uma outra caracteristicamente mais fluida denominada de cristal-líquido (Figura I-15). A transição de uma fase para a outra ocorre por variação da temperatura, com efeito, a cada fosfolípido puro disperso em água

corresponde uma temperatura, denominada de transição de fase (T_m), à qual as cadeias hidrocarbonadas da molécula transitam de um estado para o outro ^(43, 48, 54).

A temperatura de transição de fase é característica de cada lípido, compreendendo um intervalo de temperaturas no caso de lípidos de composição heterogênea. Para um fosfolípido puro, os valores de T_m restringem-se a um intervalo de $\pm 0,5$ °C, mas para uma mistura o intervalo pode abranger valores de mais de 10 °C. Esta temperatura de transição de fase dos fosfolípidos é consequência da natureza do grupo polar que os constitui, bem como do comprimento e grau de saturação das cadeias acílicas, e no geral, aumenta com o comprimento das cadeias dos ácidos gordos esterificantes e diminui com o grau de insaturação ⁽⁵⁴⁾.



Figura I-15: Representação esquemática da organização estrutural apresentada pelas cadeias hidrocarbonadas dos fosfolípidos no estado de cristal-líquido e de gel-sólido.

Quando a temperatura do sistema é inferior à T_m dos fosfolípidos constituintes de uma bicamada, esta apresenta uma estrutura ordenada, com as cadeias hidrocarbonadas dispostas numa conformação distendida e firmemente empacotadas e com uma liberdade de movimentos muito restrita. Acima da T_m verifica-se um aumento considerável na mobilidade das cadeias hidrocarbonadas, verificando-se também um aumento da área ocupada por cada molécula de fosfolípido, repercutindo-se na espessura da bicamada que sofre diminuição ^(43, 54).

A formação das vesículas lipossômicas só é viável quando os lípidos constituintes são manipulados a temperatura superior à respectiva T_m , pois é este valor que determina a temperatura mínima necessária à penetração da água entre as camadas lipídicas com formação dos lipossomas ⁽⁴⁸⁾. Após a formação da estrutura, a temperatura já poderá descer abaixo da T_m sem que com isso resulte a destruição das vesículas formadas.

A fase em que se encontra a bicamada fosfolipídica é de grande importância uma vez que influência acentuadamente a estabilidade e comportamento da bicamada. Porém, o

comportamento de uma bicamada pode também ser alterado por incorporação de moléculas não fosfolipídicas, por exemplo o colesterol é conhecido como modulador da fluidez, também a presença de uma componente proteica altera o comportamento termodinâmico da bicamada desencadeando um aumento ou diminuição da fluidez membranar de acordo com as características da proteína e do modo como interage com a componente lipídica ^(41, 43).

A dinâmica e organização estrutural das moléculas de fosfolípido nas bicamadas têm repercussões fundamentais ao nível da funcionalidade das membranas biológicas. O esclarecimento das interacções desenvolvidas entre fármacos e membrana biológica requer um conhecimento detalhado da configuração e distribuição espacial dos diferentes componentes membranares de forma a melhor se interpretar as alterações impostas por acção de moléculas extramembranares.

Nas bicamadas de fosfatidilcolina as moléculas deste fosfolípido dispõem-se com o esqueleto de glicerol alinhado de forma perpendicular ao plano membranar e o grupo fosfocolina numa linha que faz ângulo de $\sim 30^\circ$ com a superfície da membrana, sendo sugerida a mesma disposição para o fosfatidilglicerol ⁽⁵⁵⁾.

O grupo polar fosfolipídico estabelece várias ligações de hidrogénio o que resulta numa diminuição da sua liberdade de rotação ⁽⁵⁶⁾. Adicionalmente, devido aos três grupos metilénicos ligados ao azoto quaternário, a colina forma um grupo compacto, ocupando uma área de membrana (42 Å) maior do que a área das duas cadeias ácidas (~ 39 Å). Como forma de compensação, as cadeias hidrocarbonadas dispõem-se numa conformação inclinada, formando um ângulo de 58° relativamente ao plano membranar, de modo a preencher o espaço livre criado pelos grupos polares e a aumentar a proximidade entre as cadeias adjacentes, maximizando interacções do tipo das forças de Van der Waals ⁽⁴³⁾. A zona molecular do fosfolípido cujo movimento é mais restrito corresponde ao grupo glicerol. Também os grupos metilénicos mais próximos do grupo polar apresentam elevado grau de rigidez, característica que se mantém até à proximidade do carbono 9 atenuando-se à medida que se percorre a cadeia hidrocarbonada verificando-se assim uma diminuição da micro-viscosidade do meio ⁽⁴³⁾.

3.2.2 Preparação de Lipossomas

Actualmente, são numerosos os métodos de preparação de lipossomas descritos na literatura, ficando a selecção da metodologia mais adequada subjacente ao tipo de estudo a desenvolver e consequentemente ao tipo de lipossoma que mais se adequa a esse objectivo.

Para se obterem lipossomas (isto é, MLV, LUV ou SUV) tem de se introduzir moléculas lipídicas em meio aquoso. Contudo, a maioria das moléculas lipídicas são insolúveis em água e portanto, a sua dispersão directa neste meio raramente desencadeia uma formação eficaz de lipossomas pois grande parte do lípido escapa a uma hidratação eficiente já que fica encerrada no interior de estruturas apenas hidratadas nas suas camadas mais externas. Assim, de forma a facilitar a hidratação lipídica torna-se conveniente aumentar a superfície exposta ao meio aquoso, objectivo que é, normalmente, atingido preparando-se um fino filme lipídico por evaporação de uma fase orgânica em que previamente se dissolveu o lípido.

Em alternativa, existem outras metodologias de preparação de lipossomas que não implicam a formação de um filme lipídico - a de injeção, a de evaporação em fase reversa e a de desidratação/re-hidratação ⁽⁵⁴⁾.

Para além das metodologias clássicas de dispersão lipídica em meio aquoso, os lípidos podem ainda ser dispersos em meio aquoso através de recurso ao uso de um agente mediador da solubilização, como seja um detergente, que é posteriormente removido levando, normalmente, à formação de lipossomas unilamelares ⁽⁵⁴⁾.

A primeira destas abordagens, normalmente designada por método da hidratação do filme lipídico (descrito por Bangham em 1965), resulta na formação de uma dispersão muito heterogénea de vesículas lipossómicas com diferentes características no que respeita ao tamanho e número de bicamadas lipídicas, que é posteriormente tratada de forma a originar populações homogéneas de vesículas de maiores ou menores dimensões e de características adequadas à sua futura utilização. Estes tratamentos incluem métodos mecânicos, electrostáticos ou mesmo químicos, embora sejam os mecânicos os mais frequentemente utilizados e dos quais se destaca a extrusão, através de filtros com poros de diâmetro controlado, ou a sonicação (Figura I-16). Este processo de preparação pode ainda apresentar-se com algumas variantes no que respeita ao solvente orgânico utilizado, à possível adição de contas de vidro, ao modo de secagem do lípido e aos parâmetros de agitação, tais como o tempo, a intensidade e a temperatura de agitação, todas estas variações com repercussões nas características da preparação final obtida ⁽⁵⁴⁾.

Pode-se ainda considerar o uso de ciclos congelação/descongelação, técnica que permite aumentar a eficácia de encapsulação de fármacos e um melhoramento das características físicas da membrana lipídica ^(57,58). Este procedimento resulta numa alteração dramática da morfologia dos lipossomas, após cinco ciclos de congelação/descongelação os MLV abandonam o aspecto amorfo inicial apresentando-se

com espaços interlamelares aumentados e perfeitamente definidos e sistemas lamelares fechados que podem intercalar-se entre as membranas fosfolipídicas, obtendo-se assim um aumento volume aquoso interno e um melhoramento dos sistemas lamelares dos MLV⁽⁵⁹⁾.

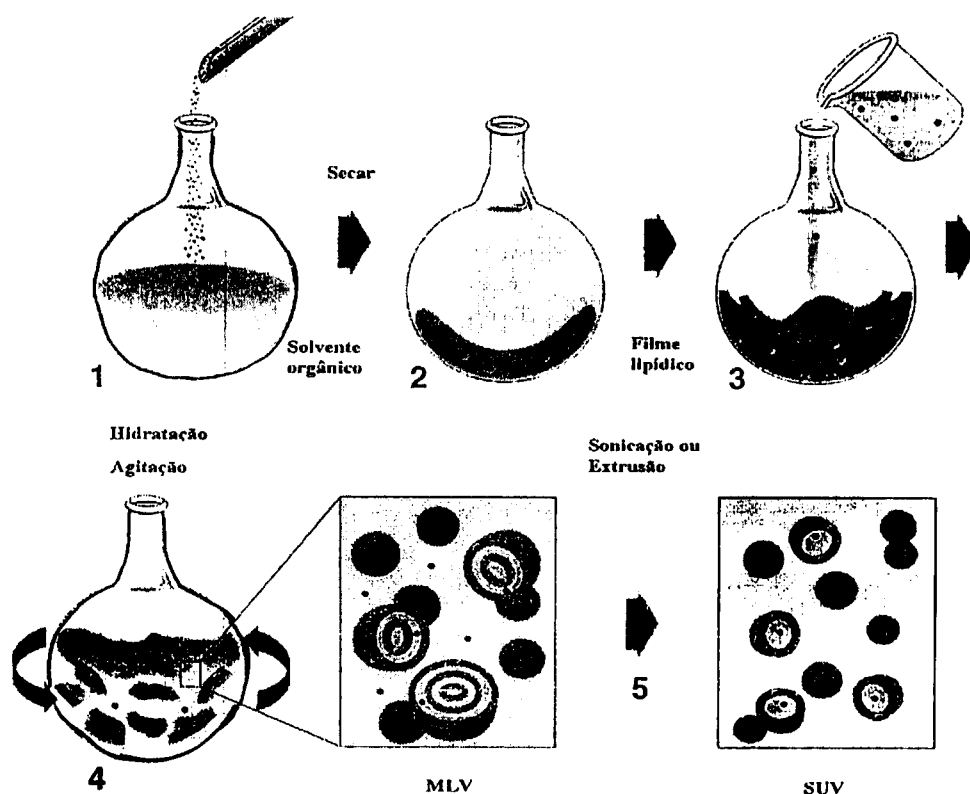


Figura I-16: Representação esquemática da preparação de MLV: 1) dissolução dos lipídios em solvente orgânico; 2) formação do filme lipídico nas paredes do balão, por evaporação à secar do solvente; 3) ressuspenção do filme lipídico em solução aquosa; 4) agitação e obtenção dos MLV; 5) processamento dos MLV por extrusão ou sonicação levando à formação de LUV.

Para se obter maior homogeneidade da suspensão lipossômica e vesículas de tamanho bem definido torna-se necessário recorrer a processamentos adicionais. Tais processamentos conduzem à obtenção de vesículas unilamelares, sendo os mais difundidos a sonicação e a extrusão.

A sonicação, que foi dos primeiros métodos utilizados para homogeneizar suspensões de MLV, pode efectuar-se em banho de água ou com ponta de titânio, caracterizando-se por produzir uma elevada transferência de energia para a suspensão e por originar vesículas de reduzidas dimensões^(43, 48).

A extrusão tem por base a passagem forçada das dispersões de MLV através de filtros de diâmetro de poro bem definido, em ambiente de gás inerte e sob pressão moderada (< 100 psi), a uma temperatura superior à de transição de fase do lípido(s) constituinte(s) da dispersão. As passagens consecutivas pelo filtro fazem decrescer o número de lamelas,

obtendo-se uma suspensão homogênea de lipossomas predominantemente unilamelares após aproximadamente 10 passagens (Figura I-17) ^(60, 61).

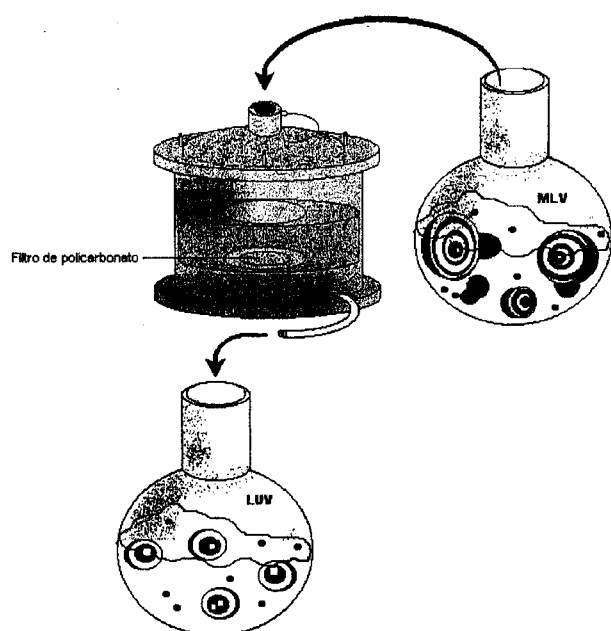


Figura I-17: Representação esquemática do processo de extrusão para a obtenção de LUV.

O diâmetro final das vesículas vai depender do tamanho de poro das membranas utilizadas e das características do próprio lípido, contudo, não se conseguem diâmetros inferiores a 50-60 nm ⁽⁵⁴⁾.

3.2.3 Selecção de Sistemas Lipossómicos

A selecção do sistema lipossómico apropriado quer para o transporte de determinado fármaco, quer para a execução de estudos biomembranares, tem como principal condicionante a utilização proposta para o sistema.

Se se pretende a encapsulação de fármaco com vista à utilização do lipossoma como transportador ou vector farmacológico, os factores limitantes serão a biocompatibilidade do lipossoma e as características do fármaco a transportar.

Quando a utilização dos lipossomas visa a simulação dos sistemas naturais, as vesículas devem possuir propriedades bem definidas com vista à compreensão do impacto de cada factor na membrana. Aos LUV tem sido atribuído um maior interesse prático pois apresentam uma única membrana e um volume interno de solução aquosa razoavelmente elevado, ao contrário dos SUV que devido à sua elevada curvatura possuem anormalidades no empacotamento dos lípidos, tornando-se muito susceptíveis de degradação ⁽⁶⁰⁾.

O valor dos lipossomas como modelo de biomembranas apoia-se no facto de as vesículas poderem ser preparadas partindo de constituintes naturais ou sintéticos, perfeitamente seleccionáveis, e que consequentemente permitem obter estruturas idênticas às membranas que se pretendem mimetizar. Esta similaridade entre lipossomas e membranas naturais pode ainda ser apurada pela inclusão de proteínas, formando um ambiente que mimetiza o natural, mas cuja composição pode ser controlada por forma a determinar o papel de cada componente em determinado fenómeno sujeito a estudo. A utilização destes agregados simples para simular sistemas muito mais complexos, permite o estudo de mecanismos fundamentais para os processos biológicos, como a absorção e transporte de moléculas exógenas, reconhecimento celular, transferência de energia, funcionamento de enzimas e fenómenos relacionados com o modo de acção dos fármacos ⁽⁶²⁾.

A interacção de determinados fármacos com a membrana lipídica parece ser essencial para o seu mecanismo de acção, como é o caso de anestésicos locais ^(63, 64), antibióticos ⁽⁶⁵⁾, β -bloqueadores ⁽⁶⁶⁾ ou fármacos moduladores de resistência celular a agentes citotóxicos ⁽⁶⁷⁾. Diversos estudos apontam para a hipótese de que a interacção não específica de certos fármacos com a membrana faz parte do seu mecanismo de acção por lhes permitir aceder aos seu alvos finais ⁽⁶⁸⁻⁷¹⁾.

Em termos de localização um fármaco pode interactuar com as membranas lipídicas dos lipossomas fundamentalmente a quatro níveis (Figura I-18):

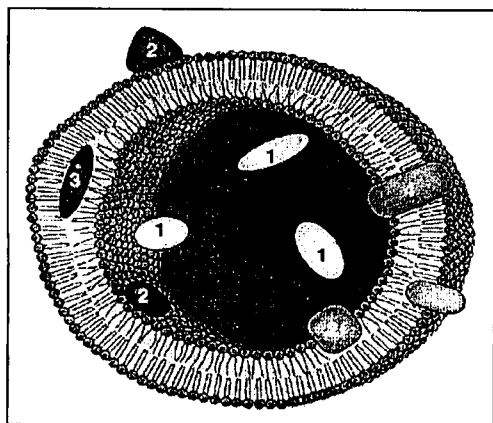


Figura I-18: Possíveis localizações de um soluto numa vesícula lipossômica. O significado da numeração da figura é apresentado no texto. Figura adaptada da referência [54].

- Fármacos hidrossólúveis podem localizar-se no interior aquoso (1) dos lipossomas ou
- Estabelecer ligações do tipo electrostático ou iónico com a zona interfacial (2) constituída pelos grupos polares, e/ou com constituintes proteicos com os quais tenham compatibilidade;

- Fármacos com carácter hidrofóbico podem localizar-se no núcleo hidrocarbonado (3) das vesículas onde podem estabelecer ligações hidrofóbicas ou de Van der Waals;

- Fármacos anfipáticos podem dispor-se de forma a exporem a parte hidrofóbica da molécula perto das cadeias fosfolipídicas e a parte hidrofílica perto dos grupos polares (4).

3.3 Micelas

As micelas são agregados de agentes anfílicos cujas porções hidrofóbicas se associam para formar regiões das quais o solvente (água) está praticamente excluído. As fracções polares dispõem-se na superfície da estrutura de modo a maximizar a interacção com a água e com os contra-íões. Uma fracção significativa dos contra-íões mantém-se ligada aos grupos polares de forma a minimizar as forças repulsivas laterais entre os grupos polares adjacentes ⁽⁶²⁾.

Uma micela tem um diâmetro entre 30 a 60 Å ⁽⁷²⁾, sendo composta por um determinado número de moléculas de monómero, designado de número de agregação, característico do agente anfílico que a compõe, e que é responsável pela forma e tamanho da estrutura organizada final.

O tipo de interacção que determinado soluto estabelece com uma micela depende das propriedades do detergente que a compõe, bem com do próprio soluto. De uma forma geral, os principais locais de interacção de solutos numa micela são (Figura I-19) ⁽⁶²⁾:

- Moléculas com características polares podem (1) adsorver-se à superfície micelar, ou (2) intercalar-se entre as “cabeças” hidrofílicas do detergente;
- Moléculas de características anfílicas podem interagir com os grupos polares do detergente e intercalar-se na zona apolar entre as “caudas” (3);
- Moléculas de maior proporção lipofílica podem inserir-se mais profundamente (4), e se totalmente apolares poderão situar-se no núcleo micelar (5);

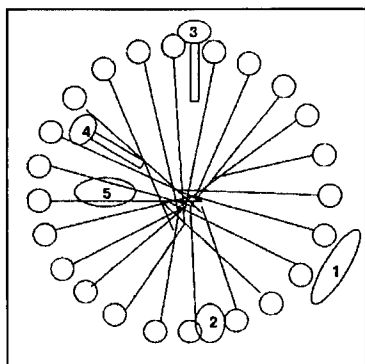


Figura I-19: Representação esquemática dos possíveis locais de ligação de um soluto numa micela. O significado dos números de 1 a 5 é descrito no texto.

Consequência do carácter dinâmico característico das estruturas micelares, determinada localização de determinado soluto, corresponderá sempre a uma posição média a longo do tempo.

3.3.1 Estrutura, propriedades e configuração molecular dos detergentes

Os detergentes representam outra importante classe de agentes anfífilos, que embora não fazendo parte dos constituintes membranares, têm lugar de destaque em numerosos estudos graças às suas características particulares.

O comportamento destes compostos em solução aquosa é bastante característico, pois os seus monómeros exibem uma certa solubilidade, porém uma vez excedida a sua concentração micelar crítica (CMC) agregam-se formando micelas. Por concentração micelar crítica entende-se a mínima concentração a partir da qual as moléculas individuais de detergente se agregam formando micelas. A CMC varia com diversas condições entre as quais o pH, a força iónica, a temperatura, bem como a presença de componentes proteicas ou outras componentes lipídicas. Esta concentração é também específica de cada detergente variando com o tamanho e características das componentes polar e apolar da molécula ⁽⁷³⁾.

A classificação dos detergentes é feita com base na sua estrutura, constituindo prática comum dividi-los em três principais categorias:

1) Detergentes não iónicos, apresentam-se com cabeças polares não carregadas, normalmente compostas ou por grupos polioxietilénicos ou glicosídicos (Tabela I-3A). Estes detergentes são bastante mais suaves que os detergentes iónicos, sendo normalmente considerados não desnaturantes pois facilmente se interpõem entre outras moléculas de lípido quebrando as interacções lípido/lípido ou eventualmente lípido/proteína. Porém não são capazes de quebrar as ligações proteína/proteína, o que lhes permite solubilizarem proteínas membranares sem lhes afectar as suas características estruturais, isolando-as na sua forma biologicamente activa ⁽⁷⁴⁾.

2) Detergentes iónicos, contêm uma cabeça polar carregada, positiva ou negativamente, a qual se associa a uma zona hidrófoba que pode constituir-se de uma cadeia hidrocarbonada ou de uma estrutura esteróide (Tabela I-3 B₁ e B₂). Os detergentes iónicos, como o SDS, são extremamente eficazes, por exemplo, na solubilização de proteínas membranares, porém, estão normalmente associados a uma acção desnaturante ⁽⁷³⁾.

Estrutura Química	Nome Químico
A - Detergentes não iônicos	
	Octil-β,D-glucopiranosideo (OG)
	X = 10, Y = 22: BRIJ-35 X = 6, Y = 0 a 10: Octil polioxiétileno (8-POE)
B – Detergentes Iônicos:	
B₁ – Detergentes Aniônicos	
	Dodecilsulfato de sódio (SDS)
B₂ – Detergentes Catiônicos	
	Brometo de octiltrimetilamónio (OTAB)
B₃ – Detergentes Bipolares	
	() = Ácido 3-[(colamidopropil) dimetilamónio] propanosulfónico (CHAPS)
	Diheptanoilfosfatidilcolina (DHPC)

Tabela I-3: Exemplos de detergentes das diversas classes em que se agrupam.

3) Os detergentes de características bipolares (Tabela I-3 B₃) combinam as características dos detergentes iônicos e não iônicos, mostrando-se, de um modo geral, bastante menos desactivantes que os detergentes iônicos embora se mostrem mais

agressivos que os detergentes não iônicos⁽⁷³⁾. A sua principal aplicação reside ao nível do estudo estrutural de proteínas membranares^(75, 76).

3.3.2 Importância das micelas

A capacidade que as micelas apresentam em solubilizar as mais variadas substâncias imprime-lhes elevada importância a nível biológico e farmacêutico, bem como no campo da análise química. Detergentes naturais como os sais biliares, fosfolípidos e glicosídeos esteróis, são importantes componentes das estruturas biológicas desempenhando papéis fundamentais como componentes de estruturas biológicas e ao nível da absorção e transporte de substâncias exógenas⁽⁶²⁾.

Paralelamente existem algumas vantagens que tornam os sistemas micelares atractivos como objectos experimentais⁽⁴²⁾:

- Facilidade de preparação;
- Elevada estabilidade;
- Estão extensivamente caracterizados na literatura;
- Modelos extremamente simplificados, constituídos apenas por dois compartimentos.

Contudo, como modelos membranares têm uma aplicabilidade limitada e restrita a avaliações preliminares consequência da sua falta de semelhança estrutural com os sistemas que pretendem mimetizar.

3.3.3 Micelas mistas

Uma micela mista define-se como um agregado, em cuja estrutura existem agentes anfílicos de mais que uma espécie. Empiricamente, pelo menos uma dessas espécies químicas deverá ter a capacidade para formar micelas simples em solução aquosa^(77, 78).

Quando moléculas anfílicas que originam micelas são misturadas com moléculas anfílicas que se organizam em vesículas, pode ocorrer a formação dos mais variados tipos de estrutura, que vão desde interfaces altamente curvas a estruturas mais achatadas, tudo dependendo das proporções da mistura. O que normalmente é observado é que o constituinte em maior quantidade na mistura define o tipo de estrutura adoptada, ficando o constituinte minoritário como mera impureza da estrutura principal, embora responsável pela alteração de algumas das suas propriedades. Com o aumento da quantidade em constituinte minoritário desencadeiam-se alterações provocadas pela sua sucessiva inserção na estrutura principal. Tais alterações podem não ser comportáveis pela estrutura inicial o

que resulta na formação de uma nova estrutura compatível com as características de ambos os constituintes ⁽⁷⁹⁾.

Por exemplo, a mistura de detergentes como o DHPC ou o CHAPS com lípidos de cadeia curta como o DMPC formam-se estruturas discoidais conhecidas como micelas em disco ⁽⁸⁰⁾. As micelas discoidais têm uma concentração em detergente inferior às micelas mistas tradicionais, apresentando algumas das características das bicamadas o que as torna potencialmente mais úteis como modelos de ambiente membranar (Figura 1-10) ⁽⁷³⁾.

Os estudos biofísicos em micelas mistas e a própria concepção deste tipo de estrutura adquirem particular significado para o estudo de proteínas membranares. A importância dos detergentes como ferramentas essenciais no isolamento e purificação de proteínas membranares não deve ser menosprezada, estas proteínas são normalmente solubilizadas em micelas compostas por detergente as quais funcionam como uma aproximação simplificada do ambiente membranar de origem da proteína, mas nem sempre garantem a estabilidade estrutural e funcional da mesma.

A situação ideal para estudos *in vitro* de proteínas membranares consiste em recriar de forma o mais aproximadamente possível o ambiente membranar nativo, isto é, estruturas organizadas em bicamada lipídica de composição semelhante à membrana de origem. Porém, a introdução criteriosa de lípidos a um sistema micelar inicial já proporciona um ambiente mais próximo do nativo que aquele constituído apenas por detergente, sem que isso acarrete grande acréscimo de complexidade ao sistema ⁽⁷³⁾, o que faculta uma abordagem simplificada aos parâmetros em estudo.

3.4 Reconstituição de proteínas membranares: Proteolipossomas

As proteínas membranares desempenham papéis vitais em numerosos processos celulares como a produção de energia, as funções de transporte ou permeação membranar, o reconhecimento celular, entre outras. Contudo a complexidade da maioria das membranas biológicas dificulta o estudo diferenciado das diferentes componentes proteicas. Assim, a purificação da proteína em estudo da membrana nativa e a sua posterior incorporação numa membrana artificial, constitui actualmente um passo crucial no estudo da estrutura e funcionalidade dessas moléculas. Note-se que grande parte das proteínas membranares apenas desenvolve correctamente a sua actividade quando adequadamente inserida e orientada numa bicamada lipídica ⁽⁷³⁾. Este tipo de comportamento cria a necessidade de um estudo detalhado de uma metodologia de reconstituição adequada quer

às necessidades do parâmetro a estudar mas principalmente compatível com a proteína em questão.

As vesículas fosfolipídicas contendo proteínas incorporadas na sua estrutura são designadas de proteolipossomas. Este tipo de agregado constitui o modelo membranar ideal para a elucidação da estrutura e funcionalidade das proteínas membranares ⁽⁷⁴⁾ e consequentemente para o esclarecimento de possíveis interações com compostos externos. Contudo, a utilização destas estruturas como modelos miméticos de membranas biológicas requer o cumprimento de alguns requisitos que vão desde uma distribuição homogénea de tamanhos nas estruturas obtidas a uma distribuição homogénea da componente proteica por todas as vesículas lipossómicas presentes. Paralelamente, se o estudo a efectuar pretende elucidar uma qualquer actividade de transporte através da membrana, também a permeabilidade membranar, a direcionalidade e topologia da proteína na bicamada se tornam bastante importantes, revelando-se essencial que a inserção proteica na bicamada lipídica apresente uma única orientação.

3.4.1 Metodologias de preparação de proteolipossomas

Como se evidenciou anteriormente existem numerosas metodologias de preparação de lipossomas e dada a existência de um certo paralelismo entre os mecanismos que explicam a formação dos lipossomas e a formação dos proteolipossomas, grande parte das metodologias de reconstituição proteica em bicamada lipídica tem uma base comum com metodologias para a obtenção de lipossomas ⁽⁵⁴⁾. Porém, a utilização directa de tais metodologias na preparação de proteolipossomas fica sujeita a numerosas restrições impostas pela necessidade de proporcionar condições favoráveis à manutenção da integridade estrutural e funcional da proteína a reconstituir ⁽⁸¹⁾.

Da análise da abundante literatura sobre reconstituição de proteínas membranares ^(73, 79, 81-84), destacam-se três principais estratégias (Figura I-20): a reconstituição com recurso a solvente orgânico, a reconstituição por meios mecânicos e a reconstituição mediada por detergente (incorporação directa em lipossomas pré-preparados e a incorporação por depleção de detergente de uma mistura micelar contendo a proteína).

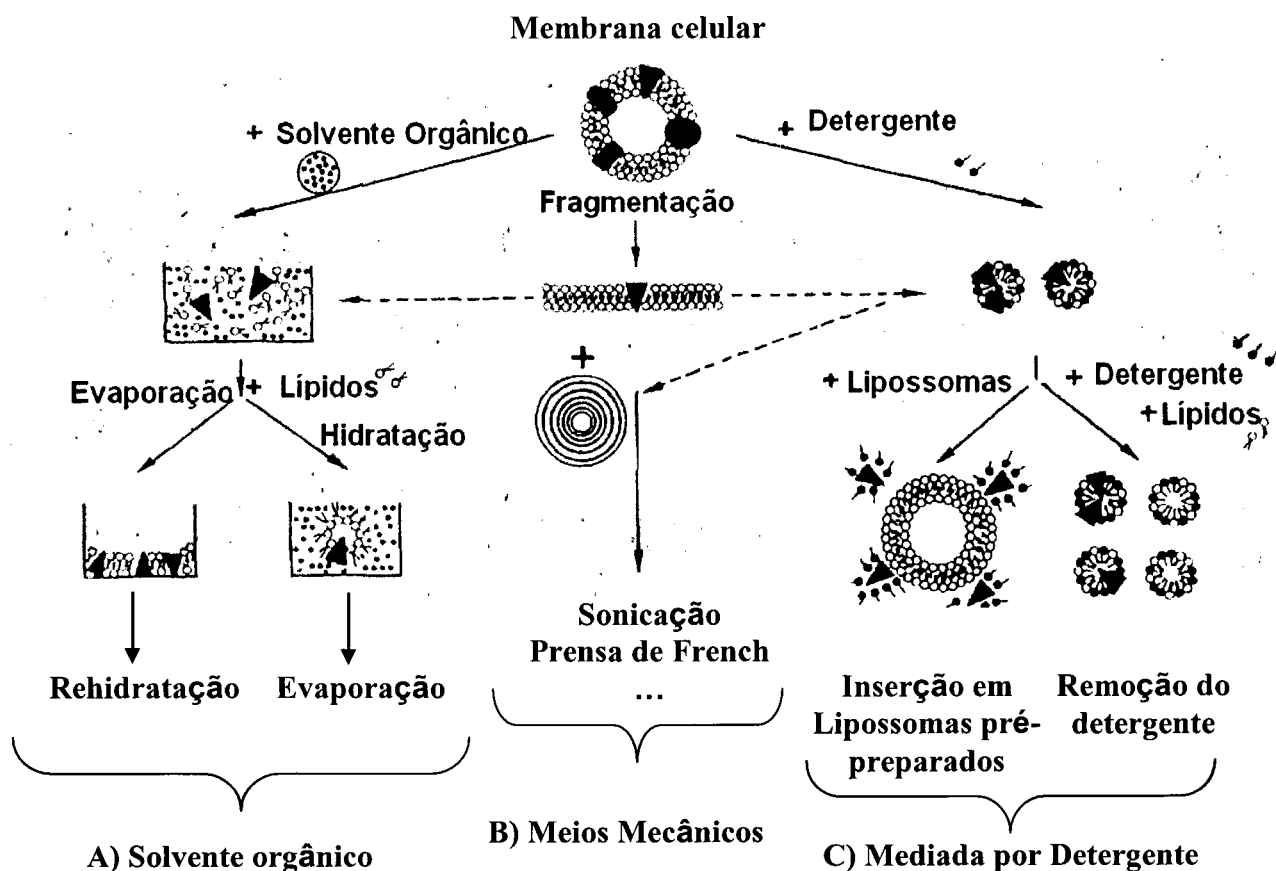


Figura I-20: Representação esquemática das diferentes estratégias de reconstituição de proteínas membranares em lipossomas. Partindo das membranas biológicas nativas as proteínas membranares podem ser isoladas quer sob a forma de micelas de detergente ou dissolvidas em solvente orgânico. Após terem sido isoladas e purificadas, às proteínas membranares é adicionado um excesso de fosfolípido, procedendo-se à reconstituição proteica em lipossomas de acordo com uma das estratégias salientadas (A, B ou C). Imagem adaptada da referência [83].

A) Reconstituição com recurso a solvente orgânico:

Os solventes orgânicos são utilizados na preparação de lipossomas de elevado volume de compartimento aquoso interno. Este tipo de procedimento inclui metodologias como a injeção de etanol e a evaporação em fase reversa. Contudo, a utilidade de tais estratégias para a reconstituição de proteínas membranares mantém-se bastante limitada pois a exposição da maioria destas proteínas aos solventes orgânicos vulgarmente utilizados provoca a sua desnaturação⁽⁸³⁾.

Deste conjunto de metodologias a única que se tem mostrado adequada para a reconstituição de proteínas membranares foi descrita por Szoka e Papahadjopoulos (1978)⁽⁸⁵⁾. A estratégia descrita por estes autores descreve a formação de proteolipossomas unilamelares, de grandes dimensões (0,2 – 5 µm), partindo de uma emulsão água/óleo de fosfolípido/proteína/tampão aquoso em excesso de solvente orgânico, o qual numa fase

posterior é removido. Os proteolipossomas obtidos por esta metodologia cumprem os principais critérios necessários à sua utilização mesmo como sistemas modelo de biomembranas. Porém, a falta de um procedimento geral de transferência da componente proteica hidrofílica para um solvente apolar mantendo a sua forma activa, tem inibido uma maior aplicabilidade desta metodologia ⁽⁸³⁾.

B) Reconstituição por meios mecânicos:

A exposição de um filme lipídico a um excesso de tampão aquoso desencadeia a formação espontânea de MLVs. Para se obterem dessa suspensão LUVs ou SUVs torna-se necessário dissipar alguma energia no sistema de MLVs, sendo que para esse efeito é frequente o recurso à sonicação ou à passagem através de uma prensa de French ⁽⁸³⁾. Seguindo a mesma lógica experimental, a aplicação destas metodologias a suspensões contendo lípido e proteína tem sido utilizada para a obtenção de proteolipossomas ⁽⁸³⁾.

Este tipo de metodologia apresenta como principais vantagens a rapidez e a ausência de contaminantes (detergente ou solvente orgânico) na mistura final. Contudo, a sua falta de reprodutibilidade, a frequente inactivação proteica ao longo do procedimento, o reduzido tamanho dos proteolipossomas obtidos (20-40 nm) e a consequente instabilidade das estruturas formadas ⁽⁸³⁾, reduziram a utilização deste tipo de procedimento à produção de proteolipossomas adaptados a técnicas electrofisiológicas ^(86, 87).

C) Reconstituição mediada por detergente:

A reconstituição proteica mediada por detergente é das mais difundidas na literatura, mostrando ser, normalmente, bem sucedida e paralelamente bastante conveniente pois o detergente é utilizado nas fases precedentes de isolamento e purificação de proteína ⁽⁷³⁾.

Este tipo de metodologia tem duas possíveis abordagens. A primeira consiste simplesmente num procedimento de diluição, supondo-se que se uma mistura de proteína/detergente for diluída numa suspensão lipossómica, de tal forma que a concentração de detergente atinja valores abaixo da sua CMC, os agregados micelares desfazem-se e a proteína é transferida para os lipossomas. Nesta abordagem, o detergente adicionado à suspensão de lipossomas previamente preparados, ao interpor-se entre as moléculas de lípido causa perturbação das interacções lípido/lípido desencadeando um aumento da permeabilidade da bicamada. Assim, estas estruturas tornam-se bastante mais receptivas à inserção proteica. Após a inserção proteica as moléculas de detergente devem ser removidas de forma a restabelecer a permeabilidade habitual das vesículas ⁽⁷³⁾.

A incorporação espontânea de proteínas membranares em vesículas lipossômicas pré-formadas, desde as primeiras abordagens, tem-se demonstrado mais eficiente quando catalizada por pequenas quantidades de detergente ⁽⁸⁸⁻⁹²⁾. Contudo, existem algumas referências à incorporação espontânea de proteínas membranares na ausência de detergente, mas estas apenas se verificaram em situações bastante pontuais e com lipossomas de composição lipídica muito específica ⁽⁹⁰⁾.

A grande vantagem desta metodologia reside na unidirecionalidade de orientação das proteínas inseridas, confirmada em numerosos exemplos de aplicação desta metodologia ^(81, 82, 84, 93). Uma possível explicação para esta ocorrência reside no facto de apenas neste tipo de metodologia se verificar uma abordagem da proteína à bicamada sempre pela extremidade mais hidrofóbica, que constitui a mais favorável, consequentemente, a inserção tende a ocorrer sempre de igual forma para cada unidade proteica ⁽⁸³⁾.

Paralelamente, são também apontadas algumas desvantagens a esta metodologia, desde a obtenção de intervalos alargados de tamanho das vesículas, bem como a presença de detergente na mistura final, que mesmo em quantidades vestigiais constitui fonte de erro, principalmente, em estudos envolvendo a permeabilidade membranares. Contudo, qualquer uma destas desvantagens inerentes à metodologia pode facilmente corrigir-se recorrendo a técnicas como a extrusão, que uniformiza o tamanho das vesículas e a técnicas de remoção do contaminante, por exemplo, por adição de material adsorvente.

Uma segunda abordagem a este tipo de metodologia envolve a co-micelinização da proteína num excesso de fosfolípido e detergente, obtendo-se uma solução de micelas mistas lípido/proteína/detergente e lípido/detergente. Numa fase seguinte, o detergente é removido da solução micelar, o que resulta numa formação progressiva de vesículas lipossômicas unilamelares contendo a proteína incorporada ⁽⁸¹⁾.

Grande parte dos processos de reconstituição mediados por detergente descritos na literatura tem por base esta metodologia, deferindo posteriormente na técnica escolhida para a remoção do detergente, sendo que de entre as mais frequentemente referidos se encontram a diálise, a cromatografia por gel, a diluição e a adsorção hidrofóbica (Bio-Beads[®]).

A escolha do procedimento de remoção de detergente adequado, depende principalmente das características físico-químicas do mesmo, isto é, depende da sua cmc, do tamanho dos agregados micelares e do seu equilíbrio hidro-lipofílico ⁽⁸³⁾. Por outro lado, algumas das características dos proteolipossomas obtidos são bastante condicionadas pelo método escolhido para a remoção do detergente pois, nomeadamente no que concerne a

velocidade de remoção do detergente, existem diversas evidências de que este factor, variável para cada um dos métodos, é responsável por características tão relevantes como a homogeneidade de distribuição proteica e a morfologia das vesículas formadas⁽⁸³⁾. Assim, de entre as metodologias de remoção de detergente destacam-se, pela frequência com que são utilizadas^(83, 84):

- Diálise: Aplicável a detergentes com elevados valores de cmc e tratando-se de um procedimento bastante demorado implica que a proteína a reconstituir se mantenha estável durante esses períodos.

- Filtração por gel: Aplicável a detergentes que formem micelas de reduzidas dimensões. Os proteolipossomas formam-se espontaneamente ao longo da coluna e face às diferenças de dimensão saem em fracções distintas das micelas. Este método apresenta a vantagem da rapidez de execução, minimizando o período de contacto da proteína com o detergente, no entanto, a população de proteolipossomas formados apresenta alguma heterogeneidade de tamanhos e a presença de quantidades residuais de detergente, sendo ainda apontadas algumas situações de incorporação proteica incompleta.

- Diluição: Trata-se de uma técnica de rápida execução apresentando o inconveniente da permanência de detergente na mistura final, obrigando a passos posteriores de separação das estruturas formadas do detergente. Paralelamente, se não houver algum controle na velocidade do processo, isto é, se a diluição não for efectuada gradualmente, correm-se riscos de se obterem populações de proteolipossomas heterogéneas quer na distribuição de tamanhos, quer na distribuição da componente proteica.

- Adsorção hidrofóbica: Os detergentes, em consequência da sua componente hidrofóbica, facilmente aderem a resinas hidrofóbicas insolúveis. O recurso a esferas adsorventes de poliestireno (Bio-Beads®) como agentes de remoção do detergente proporciona um método simples e bastante reprodutível de se obterem lipossomas unilamelares e impermeáveis, produzindo-se assim proteolipossomas que satisfazem os principais critérios de uma reconstituição eficiente. Adicionalmente, a aplicação deste método tem demonstrado, através dos mais variados estudos⁽⁹⁴⁻⁹⁶⁾, elevada eficiência na remoção de todos os tipos de detergente permitindo uma remoção de detergente praticamente completa, já que, ao contrário do que acontece nos outros métodos em que a remoção do detergente acontece ao nível dos monómeros, nesta metodologia as esferas adsorventes actuam directamente sobre as micelas⁽⁵⁴⁾

Relativamente à orientação de inserção, qualquer que seja o método de remoção do detergente a reconstituição a partir de mistura micelar origina proteolipossomas em que a inserção proteica ocorre aleatoriamente.

As diferentes metodologias de reconstituição resultam em proteolipossomas com diferentes características, quer de tamanho, quer de estabilidade estrutural, quer na orientação da proteína inserida ou mesmo nas características de permeabilidade membranar. Porém, a justificação para a falta de reprodutibilidade de grande parte das metodologias de reconstituição não pode ser explicada apenas pelas variações na metodologia, mas antes resulta de um conjunto de factores que envolvem a composição lipídica, o detergente utilizado, o método para o remover e principalmente a própria proteína que se pretende inserir. Assim, apesar da extensa literatura em torno deste tema, o mecanismo de formação dos proteolipossomas, continua em grande parte dos casos mal definido, salientando-se que cada proteína membranar responderá de modo distinto a cada um dos procedimentos de reconstituição.

3.4.2 Selecção dos constituintes de uma mistura de reconstituição

De forma a melhor se otimizar um procedimento de reconstituição membranar, torna-se essencial realizar uma análise detalhada dos diversos parâmetros biofísicos e bioquímicos que exercem influência num procedimento de reconstituição membranar. A implementação de um procedimento de reconstituição compatível com a proteína a reconstituir e adequado aos estudos posteriores a realizar assume desta forma uma situação de compromisso entre os diversos objectivos a cumprir.

A escolha da componente lipídica para um sistema de reconstituição está, essencialmente, relacionada com as características da proteína a reconstituir. Ou seja, existe uma maior probabilidade de funcionalidade e estabilidade estrutural proteica se houver alguma correspondência entre a porção hidrofóbica da bicamada lipídica (comprimento das cadeias acilo) e o comprimento do segmento hidrófobo (transmembranar) da proteína ⁽⁴¹⁾. Paralelamente, algumas proteínas membranares têm exigências específicas para a componente lipídica em que se inserem, é o caso, por exemplo, da bomba de cálcio das membranas citoplasmáticas cuja activação depende da ligação a fosfolípidos aniónicos como a fosfatidilserina ^(97, 98). Assim, se for conhecida alguma restrição da proteína a reconstituir quanto à componente lipídica em que se insere,

deve tentar-se a inclusão de tal componente no sistema de reconstituição. Na ausência de qualquer informação a esse respeito torna-se prudente iniciar os estudos de reconstituição recorrendo a uma componente lipídica o mais semelhante possível ao ambiente membranar natural da proteína⁽⁸⁴⁾.

Relativamente à estrutura de inserção, os LUV são as estruturas de eleição para a reconstituição de proteínas membranares, pois são dotados de elevada estabilidade e adicionalmente apresentam um elevado volume aquoso interno o que se torna bastante útil em estudos de transporte membranar⁽⁸⁴⁾.

Como se referiu anteriormente, grande parte dos procedimentos de reconstituição envolvem a utilização de um detergente, que após inserção proteica deve ser removido do sistema. Existem diversos factores a ter em conta na escolha de um detergente para um procedimento de reconstituição. Um dos primeiros critérios que deve cumprir é a capacidade de manter a integridade estrutural e funcional da proteína a reconstituir, tornando-se assim essencial a utilização de um detergente não desnaturante. Paralelamente, o detergente seleccionado deve, também, adequar-se ao procedimento de reconstituição escolhido, isto é, aquando da sua remoção do sistema deve ser compatível com a metodologia para tal seleccionada. Por exemplo, quando se pretende remover o detergente por diálise o detergente a usar deverá apresentar elevada CMC, porém, se o procedimento de remoção de detergente for a filtração por gel, o importante é que as micelas de detergente sejam de reduzidas dimensões.

4. Métodos Experimentais

4.1 Coeficientes de partição

O termo “partição” é, normalmente, aplicado ao fenómeno de distribuição de uma determinada espécie química entre duas fases imiscíveis. A distribuição de determinada substância por cada uma de duas fases imiscíveis pode ser quantificada por um quociente de partição definido, pela IUPAC, como a razão entre as concentrações da referida espécie química, no equilíbrio, em cada uma das fases. Assim, a utilização da expressão “coeficiente de partição” é considerada pela IUPAC com sendo incorrecta⁽⁹⁹⁾, justificando-se a adopção de tal nomenclatura ao longo desta dissertação, como sinónimo de “quociente de partição” ou “constante de partição”, pelo facto de se tratar de uma prática comum a sua aplicação em literatura biológica, área em que se enquadram os estudos realizados.

O conhecimento do grau de afinidade de determinado soluto por diferentes solventes é essencial para a sua caracterização e posterior manipulação nas diferentes situações em que possa ser utilizado. Se o soluto em causa for uma substância farmacologicamente activa, e que consequentemente desenvolve actividade no interior de um organismo vivo, a sua acção fica profundamente condicionada pela sua capacidade em percorrer os diferentes compartimentos do organismo. Ao longo do percurso de um fármaco, desde que é administrado, até ao local de acção e posterior excreção, são inúmeras as biomembranas que terá de transpor e os meios de diferentes polaridades em que terá de se difundir. Assim, na tentativa de se perceber e melhorar qualquer propriedade do mesmo é essencial conhecer as suas características de lipossolubilidade, informações reconhecidas como cruciais para a sua acção terapêutica.

Inicialmente, a informação sobre as características de partição de um fármaco era obtida a partir do coeficiente de partição entre o 1-octanol e a água (K_{OA}), tendo-se aplicado extensivamente a este indicador nas mais diversas áreas, desde o desenho racional de novos fármacos, aos estudos de biodisponibilidade⁽¹⁰⁰⁻¹⁰⁴⁾.

No entanto, após os primeiros estudos foram evidenciadas falhas no sistema de partição octanol/água, tendo sido apontada uma perda de correlação linear com a actividade biológica para valores de K_{OA} relativamente elevados⁽¹⁰⁵⁾. De facto, a partição de uma espécie molecular no sistema octanol/água é devida fundamentalmente à forma não ionizada da molécula⁽¹⁰⁶⁻¹⁰⁷⁾, ao contrário do que se observa com as membranas naturais, que são capazes de estabelecer interações com as moléculas na sua forma ionizada.

Claramente, o sistema octanol/água é insuficiente para contabilizar certas características críticas das membranas biológicas, que possuem grupos anfipáticos capazes de estabelecerem interações electrostáticas fortes. Os solventes orgânicos formam uma fase compacta e isotrópica quanto às suas propriedades físico-químicas, observando-se uma continuidade ao longo de toda a fase, enquanto que a bicamada lipídica pode ser considerada uma fase interfacial de matéria na qual as propriedades físicas variam com a distância à superfície, ao longo do eixo normal da bicamada ⁽¹⁰⁸⁾.

Assim, o recurso a sistemas estruturados, constituídos por moléculas anfipáticas, como os lipossomas, tornou-se bastante apelativo devido à facilidade de obtenção e manipulação, estabilidade físico-química e versatilidade apresentadas por estes sistemas, que são largamente utilizados como modelos membranares. Os lipossomas têm vindo a substituir gradualmente os sistemas octanol/água nos ensaios de determinação de coeficientes de partição, devido principalmente ao seu arranjo molecular ordenado, semelhante ao das membranas naturais, que varia de um estado de cristal líquido a um estado de gel, mas também pela possibilidade de estudar as influências electrostáticas durante os fenómenos de partição. A incapacidade do n-octanol alterar as suas propriedades estruturais e as enormes diferenças existentes relativamente à composição das membranas celulares, ditam a sua cada vez maior inaplicabilidade neste tipo de estudos e a sua substituição progressiva por vesículas lipossómicas.

Os lipossomas, devido à sua semelhança estrutural com as membranas celulares, têm demonstrado fornecer uma boa correlação relativamente ao transporte de fármacos pelas biomembranas, ao seu comportamento farmacocinético e à actividade biológica de certas classes de compostos, permitindo estudos mais ou menos detalhados acerca das interações fármaco/célula, que têm vindo a adquirir uma importância crescente dada a complexidade estrutural dos sistemas *in vivo* ⁽¹⁰⁹⁾.

Os métodos de determinação dos coeficientes de partição lipossoma/fase aquosa podem ser divididos em dois grupos, de acordo com o procedimento base. No primeiro grupo incluem-se os métodos que recorrem à separação de fases, envolvendo, por exemplo, processos de filtração, de centrifugação e de diálise, seguidos da determinação quantitativa de soluto em cada uma das fases. A quantificação do soluto nas diferentes fases é feita recorrendo às técnicas habituais em análise quantitativa, como, por exemplo, as espectroscopias.

O segundo grupo é constituído pelas metodologias que não recorrem à separação de fases. Neste conjunto de métodos a determinação do coeficiente de partição é efectuada na

mistura total, isto é, o soluto ligado encontra-se em equilíbrio com o soluto livre em solução. A determinação é efectuada com base na avaliação da modificação das propriedades de um dos componentes do sistema: a) do soluto após interacção com o lípido, tais como as suas propriedades espectroscópicas ⁽¹¹⁰⁾, potenciométricas ⁽¹¹¹⁾, ou de acidez ⁽¹¹²⁾; b) do lípido por acção do soluto, como a permeabilidade ⁽¹¹³⁾, a fluidez ⁽¹¹⁴⁾, a temperatura de transição de fase ⁽¹¹⁵⁾; c) ou finalmente, de uma propriedade de uma terceira molécula que incorporada no sistema funcionará como uma sonda ⁽¹¹⁶⁻¹¹⁸⁾.

Assim, a vantagem clara do segundo grupo de metodologias relaciona-se com o facto de não ocorrer alteração do sistema em estudo, mantendo-se os respectivos equilíbrios químicos estabelecidos entre as moléculas que o constituem. Por outro lado, além das metodologias com separação de fases interferirem com os equilíbrios estabelecidos, são geralmente mais demoradas e laboriosas, não obstante, são os mais usuais, tendo sido historicamente, os primeiros a ser usados para a determinação dos K_p .

Nos próximos itens serão descritos os métodos utilizados neste trabalho para a determinação do K_p da fluoroquinolona moxifloxacina entre uma fase aquosa e vesículas lipossómicas; são também apresentados os modelos matemáticos utilizados no cálculo desses coeficientes, bem como os cuidados a ter na utilização de cada técnica e as limitações que lhe são inerentes.

4.1.1 Determinação de coeficientes de partição por espectrofotometria derivativa de UV-Vis

A determinação do coeficiente de partição (K_p) de um soluto entre as fases aquosa e lipídica usando métodos espectroscópicos baseia-se na variação das características espectrais do soluto quando este se localiza em meios com características polares distintas. A determinação do K_p entre um sistema organizado e o meio aquoso pode ser efectuada por espectrofotometria de UV-Vis quando o soluto possui diferentes características espectrais, alterações da absorvidade molar (ϵ) e/ou ao nível do comprimento de onda (λ_{max}), quando dissolvido em solução aquosa ou em interacção com a fase lipídica.

A utilização da espectroscopia de UV-Vis para o cálculo dos coeficientes de partição apresenta bastantes vantagens, pois não só a maioria dos compostos possui propriedades espectroscópicas facilmente mensuráveis, que dependem da natureza química do meio e são proporcionais à concentração do mesmo em cada uma das fases, como, adicionalmente, a sua sensibilidade (limite de detecção) permite geralmente o uso de concentrações semelhantes às encontradas nos sistemas naturais.

A ocorrência de desvios significativos nos valores de comprimentos de onda entre os espectros dos fármacos na fase aquosa e membranar (= 5-10 nm) e/ou variações de ϵ entre os dois solventes (= 10 %), torna possível a quantificação do K_p a partir do comprimento de onda ou das variações de ϵ a um valor fixo de comprimento de onda ^(119, 120).

Porém, a presença de estruturas heterogêneas no sistema em análise causa turbidez, originando dispersão de luz, principalmente a comprimentos de onda inferiores a 400 nm, o que se traduz num aumento da absorvância em regiões em que não existem cromóforos a absorver e que resulta da diminuição da quantidade de luz que atinge o detector ⁽¹²¹⁾. Estas interferências espectroscópicas, bem como a absorvância das próprias micro-estruturas, dificultam grandemente a análise das variações da absorvância do soluto.

Diversos métodos têm sido desenvolvidos para eliminar a perturbação causada pela dispersão de luz sem recorrer a técnicas de separação de fases, nomeadamente, o uso de referência interna, a modelação da dispersão, a análise multicomponente e a espectrofotometria derivativa, sendo este último um dos mais eficientes e de mais fácil aplicação ⁽¹²²⁾.

A espectrofotometria derivativa é uma técnica analítica de grande utilidade na análise quantitativa e qualitativa de espectros compostos por bandas sobrepostas ou distorcidas por interferências. Esta técnica possibilita o melhoramento da resolução de sinais espectrais por diminuição da largura das bandas, evidenciando detalhes espectrais e facilitando a determinação do valor do comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{\max}$). Permite ainda a resolução de bandas sobrepostas, que pode ser conseguida através de métodos computacionais, o desdobramento de espectros compostos e, finalmente, facilita a detecção de picos afectados pela presença de impurezas, diminuindo ou mesmo anulando, interferências espectrais como a dispersão de luz ⁽¹²³⁻¹²⁵⁾. Contudo, é de se referir que a utilização da espectrofotometria derivativa também apresenta desvantagens, sendo a principal a diminuição da razão sinal/ruído que se torna mais acentuada para derivadas de ordem mais elevada, embora esta diminuição possa ser atenuada com a regularização dos espectros derivados ⁽¹²⁶⁾.

4.1.1.1 Modelos matemáticos para o cálculo dos coeficientes de partição

O coeficiente de partição molar dos fármacos entre as bicamadas lipídicas dos lipossomas e a solução aquosa é definido como:

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

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

Conforme já se referiu anteriormente, o coeficiente de partição pode ser determinado a partir de alterações na absorção do fármaco causadas pela sua ligação às vesículas.

Nas condições em que é válida a lei de Lambert-Beer, a absorvância (A) de uma solução contendo uma dada concentração total de fármaco (C_T), e a um valor fixo de comprimento de onda, que é partilhado entre a fase membranar (L) e a aquosa (Aq), é dada por:

$$A = A_L + A_{Aq} \quad \text{e/ou} \quad A = \varepsilon_L \cdot C_L + \varepsilon_{Aq} \cdot C_{Aq} \quad (1.1)$$

onde ε_L e ε_{Aq} representam as absorvidades molares do fármaco na membrana e em solução aquosa respectivamente.

Partindo de uma concentração total de fármaco C_T , $C_T = C_L + C_{Aq}$ e definindo $e = \varepsilon_L - \varepsilon_{Aq}$, a equação anterior pode ser escrita como:

$$A = \varepsilon \cdot C_L + \varepsilon_{Aq} \cdot C_T \quad (1.2)$$

À diferença entre os valores das absorvâncias dos fármacos na presença e na ausência da fase lipídica vai-se chamar ΔA , que é definida por:

$$\Delta A = A - \varepsilon_{Aq} \cdot C_T \quad (1.3)$$

Daqui obtém-se as seguintes relações $\Delta A = e \cdot C_L$ e $\Delta A_{\text{máx}} = e \cdot C_T$.

Atendendo à definição da constante de partição, pode reescrever-se a equação (1.0) da seguinte forma:

$$\Delta A = \frac{K_P \varepsilon C_T [L]}{[Aq] + K_P [L]} \quad (1.4)$$

Tal como as absorvâncias também as intensidades obtidas após derivação dos espectros são proporcionais à concentração de fármaco, desde que os fenómenos de dispersão de luz intrínsecos à presença dos lipossomas sejam completamente eliminados.

Representando $d^2Aq / d^2\lambda$ por D e $d^2e / d^2\lambda$ por E, ΔD e K_p podem relacionar-se através de uma expressão formalmente idêntica à anterior:

$$\Delta D = \frac{K_p E C_T [L]}{[Aq] + K_p [L]} \quad (1.5)$$

Os valores de coeficiente de partição, K_p , podem assim obter-se por ajuste da equação (1.5) aos dados experimentais obtidos (ΔD vs $[L]$), isto para uma dada concentração total de fármaco, utilizando-se um método de regressão não linear.

4.1.2 Determinação de coeficientes de partição por espectrofluorimetria

Designa-se por luminescência a emissão de luz de qualquer substância a partir de estados electronicamente excitados. Formalmente, distinguem-se dois tipos de luminescência, consoante a multiplicidade de *spin* do estado excitado: a fosforescência que consiste na emissão a partir de estados tripletos excitados, enquanto que a fluorescência diz respeito à emissão a partir de estados singuletos excitados. Assim, a fluorescência ocorre sempre que um composto (fluoróforo) contendo duplas ligações conjugadas, geralmente moléculas aromáticas, absorve luz de uma determinada energia, transita para um estado excitado singleto e ao regressar ao estado fundamental liberta essa energia sob a forma de luz. A excitação electrónica é inevitavelmente acompanhada de actividade vibracional e rotacional da molécula⁽³⁹⁾.

Os parâmetros que melhor caracterizam um fluoróforo são o seu rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) e o tempo de vida de fluorescência (t). O rendimento quântico é definido como sendo a razão entre o número de fótons emitidos pelo fluoróforo (G) e o número de fótons absorvidos pelo mesmo ($G + k_{nr}$), sendo traduzido por:

$$\Phi_f = G / (G + k_{nr}) \quad (2.0)$$

sendo k_{nr} a fracção de decaimento não radioactivo de energia durante o regresso ao estado fundamental.

O tempo de vida do estado excitado, corresponde ao tempo dispendido pelos fluoróforos no estado excitado antes de regressarem ao estado fundamental e é representado por:

$$\tau = 1 / (G + k_{nr}) \quad (2.1)$$

O rendimento quântico e o tempo de vida dos fluoróforos podem ser alterados por diversos factores, capazes de afectar cada uma das constantes (G ou k_{nr}). Assim, tal como os espectros de absorção, também os espectros de fluorescência de um determinado fluoróforo pode variar com o solvente ou com o meio em que este se encontre. A polaridade dos solventes, bem como o microambiente que rodeia os fluoróforos, podem exercer profundos efeitos nos seus espectros de emissão, observando-se, geralmente, desvio batocrómicos que são tanto maiores quanto maior for a polaridade do solvente. Por outro lado, o rendimento quântico e o tempo de vida de fluorescência diminuem com o aumento da polaridade do meio ⁽³⁹⁾.

Os fluoróforos em solução encontram-se solvatados pelas moléculas de solvente através de atracções dipolares, pela presença de dipolos permanentes ou induzidos no soluto e solvente. No estado excitado, os dipolos são normalmente maiores e a sua orientação pode diferir da do estado fundamental. Deste modo, as características das interacções alteram-se imediatamente após a excitação do fluoróforo, iniciando-se um novo rearranjo molecular. Contudo, o tempo de permanência no estado excitado é curto, o que impede as moléculas de atingirem um estado energeticamente favorável. As moléculas dos fluoróforos regressam assim ao estado fundamental antes de ocorrer um equilíbrio com as moléculas que as rodeiam, e um novo equilíbrio é atingido. Durante todos estes processos parte da energia absorvida é perdida em cada uma das etapas do equilíbrio, consequentemente, quanto maior a interacção entre o fluoróforo e as moléculas que o rodeiam, maiores serão as perdas de energia. Espectroscopicamente, esta perda de energia manifesta-se por um deslocamento entre os máximos de absorção e emissão, que será tanto mais acentuado quanto maior for a polaridade do solvente. O mesmo se aplica relativamente aos fluoróforos após localização nas diferentes regiões das membranas fosfolipídicas com características de polaridade distintas ⁽¹²⁷⁾.

Todas as possibilidades de alteração espectral decorrentes de alterações das características moleculares intrínsecas facilitam a determinação de um equilíbrio de partição, pois contribuem para a quantificação dos fluoróforos nos diferentes ambientes ocupados. Paralelamente, alguns dos problemas relacionados com a detecção/análise em sistemas média ou fortemente dispersivos, de difícil resolução pelas técnicas de espectrofotometria de UV-Vis, são solucionáveis pelos métodos espectrofluorimétricos, visto a emissão de fluorescência ocorrer a maiores comprimentos de onda relativamente aos de absorção, dispensando separação de fases ou derivação de espectros.

A espectroscopia de fluorescência é actualmente uma das técnicas espectroscópicas mais usadas nas áreas nas mais diversas áreas científicas. Apesar das determinações de fluorescência não permitirem obter informação estrutural detalhada, a técnica tornou-se bastante popular graças à sua elevada sensibilidade e ao facto de se tratar de uma técnica não invasiva, permitindo o estudo de amostras *in vivo* e *in vitro* em condições biológicas naturais. Nas últimas décadas, tem-se também assistido a uma crescente utilização da espectrofluorimetria na determinação dos coeficientes de partição de fármacos em sistemas organizados, tais como as vesículas lipossómicas⁽¹²⁸⁻¹³¹⁾.

4.1.2.1 Modelos matemáticos para o cálculo dos coeficientes de partição

Tal como se referiu, o coeficiente de partição molar de fármaco entre uma fase lipídica e um meio aquoso é dado pela equação (1.0). Se as moléculas de fármaco apresentarem alterações dos seus espectros de emissão de fluorescência em função da polaridade do meio em que se encontram, então os coeficientes de partição podem calcular-se a partir das referidas alterações. O cálculo pode efectuar-se recorrendo ao método de regressão não-linear:

$$\Delta I = \frac{K_p \Delta I_{\max} [L]}{[Aq] + K_p [L]} \quad (2.2)$$

em que os valores de K_p são obtidos por ajuste da equação (2.2) aos dados experimentais (ΔI vs $[L]$) para uma determinada concentração total de fármaco.

4.2 Topografia das interacções em estruturas organizadas

A localização membranar das diferentes estruturas constituintes e das moléculas que com elas interactuam reveste-se de grande importância para o conhecimento da organização e funcionamento dos mais variados sistemas biológicos.

No caso concreto de moléculas com acção farmacológica, a localização e a extensão da interacção desenvolvida com as biomembranas e suas diferentes componentes estruturais adquire particular importância na medida que constitui factor determinante para o desenvolvimento da sua acção terapêutica.

Os fármacos distribuem-se entre a fase membranar e a fase aquosa de acordo com as suas características hidro-lipofílicas, e desta distribuição resultam diferentes concentrações em cada uma das fases e consequentemente o grau de interacção com outras moléculas

membranares ou do interior celular. Paralelamente, se o desenvolvimento de determinada acção farmacológica depende de uma permeação membranar eficaz, e se esta permeação envolve a interacção do fármaco com diferentes componentes membranares, o conhecimento da contribuição de cada uma dessas componentes na entrada do fármaco na célula é determinante para o desenvolvimento de novas moléculas com maior potência terapêutica, mais selectivas e mais eficazes.

O conhecimento da localização membranar e da interacção de fármacos com diferentes constituintes membranares envolve normalmente a utilização de modelos membranares, cuja selecção da composição e caracterização estrutural se revestem de grande importância para a validade das conclusões extraídas.

Nesta secção serão efectuadas breves abordagens aos conceitos teóricos relevantes relativamente a cada uma das metodologias utilizadas quer para a localização da fluoroquinolona Moxifloxacina nas bicamadas dos lipossomas, quer para a detecção de OmpF nas bicamadas dos proteolipossomas e ainda para localizar possíveis áreas de interacção dos fármacos com OmpF.

As metodologias utilizadas envolveram a espectroscopia de fluorescência e de ressonância paramagnética electrónica, ambas metodologias indirectas que relacionam variações às propriedades espectroscópicas de sondas membranares, em presença e na ausência, quer dos fármacos quer da porina.

Os estudos efectuados por fluorescência tiveram por base fenómenos de extinção de fluorescência e de anisotropia de fluorescência, métodos de grande utilização em sistemas bioquímicos. Por processos de extinção de fluorescência designam-se todos os mecanismos baseados em interacções moleculares que conduzem a uma diminuição da intensidade de fluorescência de uma amostra. Estes mecanismos incluem reacções de estado excitado, rearranjos moleculares, processos de transferência de energia, formação de complexos no estado fundamental (estabelecimento de ligação) e desactivação colisional ⁽³⁹⁾. A anisotropia de fluorescência fundamenta-se na determinação do grau de polarização da luz emitida por um fluoróforo, após excitação por um feixe de luz também polarizada. A anisotropia está directamente relacionada com o grau de difusão rotacional do fluoróforo durante o tempo de vida do estado excitado o qual, por seu lado, depende das características do meio onde está integrado.

4.2.1 Extinção de Fluorescência

A extinção de fluorescência tem sido amplamente estudada, não só com o objectivo de se compreender os fenómenos que lhe estão associados, mas principalmente como fonte de informação em sistemas químicos e bioquímicos.

A extinção de fluorescência pode ser dinâmica (colisional) ou estática. Na primeira situação, o estado excitado do fluoróforo é desactivado por colisão (encontro difusivo) com outra molécula em solução, o agente de extinção (Q), isto é, ocorre difusão do agente de extinção até ao fluoróforo durante o tempo de vida do seu estado excitado e, após o contacto o fluoróforo regressa ao estado fundamental sem que haja alteração química das moléculas envolvidas no processo. No caso da extinção de fluorescência por processo estático, verifica-se a formação de um complexo não fluorescente entre o fluoróforo e o agente de extinção que se mantém mesmo após o regresso ao estado fundamental.

Quando a extinção é do tipo dinâmica ou colisional os fluoróforos só são afectados no estado excitado, não se verificando alterações aos espectros de absorção. No caso da extinção ser estática, a formação de complexos fluoróforo-agente de extinção no estado fundamental, resulta em alterações aos espectros de absorção (desvios espectrais) ⁽³⁹⁾.

Em qualquer um destes tipos de extinção de fluorescência existe a necessidade de contacto molecular, facto que justifica as inúmeras aplicações desta técnica, nomeadamente, ao nível da bioquímica, das quais se destaca a localização de fluoróforos em proteínas e nas membranas ⁽³⁹⁾.

A extinção de fluorescência é um método útil na determinação da acessibilidade (e posição) de fluoróforos em membranas ou proteínas. As intensidades de um grupo triptofano localizado numa zona hidrófoba de uma proteína ou de uma sonda de membrana localizada perto do centro da bicamada serão pouco afectadas por um agente de extinção hidrófilo, ao contrário do que acontece com triptofanos na superfície da proteína ou com sondas na interface membrana/água/lípido ⁽⁴¹⁾.

Extinção de fluorescência dinâmica ou colisional

Este tipo de extinção de fluorescência ocorre por interacção colisional entre um fluoróforo e um agente de extinção de fluorescência. Neste caso, a diminuição da fluorescência pode ser relacionada com a concentração do agente de extinção pela equação de Stern-Volmer ⁽³⁹⁾:

$$F_0/F - 1 = K_D [Q] \leftrightarrow \tau_0/\tau - 1 = k_q \tau_0 [Q] \quad (3.0)$$

onde F_0 e F representam a intensidade de fluorescência do fluoróforo na ausência e em presença do agente de extinção, respectivamente. Os símbolos t_0 e t representam os tempos de vida do fluoróforo no estado excitado na ausência e na presença do agente de extinção, e k_q representa a constante de velocidade do processo de extinção de fluorescência. K_D é a constante de Stern–Volmer para a desactivação dinâmica e é dada pela expressão $k_q.t_0$. A constância da razão entre os valores de F_0/F e t_0/t constitui comprovativo de que a extinção de fluorescência é do tipo dinâmico ou colisional ⁽³⁹⁾. Assim, um gráfico F_0/F ou t_0/t em função da concentração do agente de extinção $[Q]$ origina uma recta com ordenada na origem igual a zero e declive igual a $k_q.t_0$. A constante bimolecular de velocidade de desactivação (k_q) reflecte quer a eficiência do processo, quer a acessibilidade do agente de extinção ao fluoróforo, e geralmente apresenta-se com valores na ordem dos $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ⁽³⁹⁾. Valores menores poderão ser o resultado de uma protecção estérica do fluoróforo, enquanto que valores superiores geralmente reflectem a existência de interacções envolvendo ligações entre o fluoróforo e o agente de extinção ⁽³⁹⁾.

Extinção de fluorescência estática

Neste processo, a extinção de fluorescência é causada pela formação de um complexo não fluorescente entre fluoróforo e agente de extinção, que quando absorve luz, volta imediatamente ao estado fundamental sem emissão de fotões, fenómeno que pode ser traduzido por uma equação do mesmo tipo da equação da extinção dinâmica, mas em que K_s é a constante de formação do complexo ⁽³⁹⁾:

$$F_0/F - 1 = K_s [Q] \quad (3.1)$$

a dependência de F_0/F em função de $[Q]$ continua a ser linear, tal como para a desactivação dinâmica. A distinção entre os dois fenómenos não é óbvia, sendo o método mais seguro a determinação dos tempos de semi-vida do fluoróforo pois, enquanto que para a extinção dinâmica $F_0/F = t_0/t$, para a estática $t_0/t = 1$. Esta distinção pode ainda ser conseguida por determinação da constante de extinção (K_s ou K_D) a várias temperaturas, pois o aumento da temperatura faz diminuir a viscosidade dos meios e, consequentemente, aumenta a difusão das moléculas, aumentando a constante de extinção dinâmica. Por outro lado, o aumento da temperatura diminui a estabilidade dos complexos, diminuindo a desactivação estática. Uma outra via de distinção entre os dois tipos de extinção de fluorescência consiste em examinar o espectro de absorção do fluoróforo: a desactivação dinâmica afecta apenas o

seu estado excitado, não sendo previsíveis alterações ao seu espectro de absorção, contrariamente ao que acontece quando há formação de complexo, em que podem ocorrer alterações nas bandas do espectro de absorção ⁽³⁹⁾.

Contudo, existem situações em que a distinção entre os dois mecanismos não é conclusiva nem estritamente necessária, pelo que a constante de Stern-Volmer é representada por K_{SV} , referindo-se desactivação dinâmica ou estática ⁽³⁹⁾.

Desvios à linearidade da equação de Stern-Volmer

Os processos de desactivação de fluorescência nem sempre são definidos por uma relação linear entre F_0/F e $[Q]$, podendo verificar-se desvios quer positivos (contra o eixo das abcissas) quer negativos (a favor do eixo das abcissas), que reflectem a presença de fenómenos adicionais ou alternativos aos de desactivação de fluorescência.

Desvios Positivos. A simultaneidade dos processos estático e dinâmico constitui um factor que dificulta a análise de dados de desactivação de fluorescência. Este efeito resulta numa curvatura positiva na função de Stern-Volmer. O componente estático pode corresponder ao modelo de formação de um complexo ou ao da esfera de acção. A primeira situação resulta na seguinte equação ⁽³⁹⁾:

$$F_0/F = 1 + (K_D + K_S)[Q] + K_D \cdot K_S \cdot [Q]^2 \quad (3.2)$$

outra possibilidade para a descrição deste processo tem por base a teoria da esfera de acção, que considera que quando a extensão da desactivação dinâmica é muito elevada, pode considerar-se uma esfera de volume V rodeando o fluoróforo, onde a eficácia de desactivação é unitária e, se o agente de extinção estiver suficientemente perto do fluoróforo aquando da sua excitação, a desactivação é imediata e deixa de ser regida por processos de difusão. A conjugação do modelo dinâmico com a esfera de acção resulta na seguinte equação ⁽³⁹⁾:

$$F_0/F = (1 + K_D [Q]) e^{V[Q]} \quad (3.3)$$

desta equação obtém-se o valor de K_D .

Desvios negativos. Estes desvios puderam constituir indicação da presença de múltiplas populações de fluoróforos com diferentes acessibilidades ao agente de extinção, tal como acontece com os triptofanos de uma mesma proteína mas com localização em zonas distintas da estrutura proteica.

Nesta situação, a intensidade total de fluorescência na ausência do agente de extinção de fluorescência (F_0) é dada por:

$$F_0 = F_{0a} + F_{0b} \quad (3.4)$$

Na presença do agente de extinção a intensidade de fluorescência da fracção acessível (f_a) diminui de acordo com a equação de Stern-Volmer, enquanto que a fracção inacessível não sofre extinção de fluorescência. Assim sendo, a intensidade observada é dada por:

$$F = \frac{F_{0a}}{1 + K_a [Q]} + F_{0b} \quad (3.5)$$

sendo K_a a constante de Stern-Volmer da fracção acessível e $[Q]$ a concentração do agente de extinção. Da subtracção das equações (3.5) e (3.4) obtém-se:

$$\Delta F = F_0 - F = F_{0a} \left(\frac{K_a [Q]}{1 + K_a [Q]} \right) \quad (3.6)$$

Do inverso da equação (3.6) seguido da divisão pela equação (3.4) obtém-se a seguinte equação:

$$\frac{F_0}{\Delta F} = \frac{1}{f_a K_a [Q]} + \frac{1}{f_a} \quad (3.7)$$

sendo f_a definida por

$$f_a = \frac{F_{0a}}{F_{0b} + F_{0a}} \quad (3.8)$$

Esta alteração da equação de Stern-Volmer permite então a determinação gráfica de K_a e f_a a partir do traçado de $F_0/\Delta F$ versus $1/[Q]$.

Correcções matemáticas a possíveis interferências espectrais

No caso do agente de extinção absorver ao comprimento de onda de excitação do fluoróforo torna-se necessário proceder à correcção da respectiva intensidade de fluorescência através da aplicação de uma fórmula de correcção para a excitação ⁽¹³²⁾:

$$F_{ex} = F \cdot \frac{A_T}{A_F} \cdot \frac{1 - 10^{-A_f}}{1 - 10^{-A_T}} \quad (4.1)$$

em que F_{ex} é a intensidade de fluorescência corrigida para a excitação, F a intensidade de fluorescência obtida experimentalmente, A_T a absorvância de uma solução contendo o agente de extinção e o fluoróforo na concentração utilizada nos estudos, ao comprimento de onda de excitação do fluoróforo e A_F a absorvância de uma solução contendo o agente de extinção na concentração utilizada em estudo e ao comprimento de onda de excitação do fluoróforo.

Por outro lado, considerando que o agente de extinção também absorve ao comprimento de onda de emissão do fluoróforo terá também que ser considerada a seguinte correcção:

$$F_{em} = F_{ex} \cdot \frac{2.303 \cdot A_0}{1 - 10^{-A_0}} \quad (4.2)$$

em que F_{em} é a intensidade de fluorescência corrigida para a emissão e A_0 a absorvância de uma solução contendo o agente de extinção, na concentração usada nos estudos, ao comprimento de onda de emissão do fluoróforo.

4.2.1.1 Agentes de extinção de fluorescência

Existe uma grande variedade de moléculas ou iões capazes de actuar como agentes de extinção de fluorescência. De entre os agentes de extinção de fluorescência mais estudados referem-se, como exemplos, o oxigénio molecular, a acrilamida e os átomos pesados como o iodo e o bromo.

Devido à grande variedade de substâncias existentes, é comum referir-se combinações fluoróforo-agente de extinção para cada sistema em estudo, sendo importante referir que nem todos os fluoróforos sofrem extinção de fluorescência pelos mesmos agentes, pois o fenómeno de extinção depende do mecanismo de extinção envolvido que, por sua vez, está relacionado com as propriedades químicas das moléculas envolvidas no processo ⁽³⁹⁾.

Nos estudos efectuados em estruturas organizadas é muito importante salientar-se que a eficácia da extinção depende fortemente da acessibilidade do agente de extinção face ao fluoróforo ⁽³⁹⁾. Adicionalmente, a obtenção de informação, sobre a localização membranar de uma dada substância ou dos acontecimentos em torno do ambiente estrutural de um triptofano de uma qualquer proteína, através da utilização de metodologias de extinção de fluorescência, tem por base a utilização de agentes de extinção com diferentes características de acessibilidade ao fluoróforo, quer no que se refere ao seu tamanho quer à sua carga eléctrica, de forma a se tirarem relações das diferenças nos resultados obtidos ⁽¹³³⁾.

Relativamente aos ensaios efectuados neste trabalho, destinados ao reconhecimento da localização da moxifloxacina na membrana e à definição do local de interacção das quinolonas com OmpF, foram utilizados como agentes de extinção da fluorescência emitida pela moxifloxacina e pelos triptofanos de OmpF, o ião iodeto e a acrilamida.

Tanto a acrilamida como o iodeto constituem agentes de extinção hidrossólúveis, porém apresentam características bastante distintas quer no que respeita à presença de carga eléctrica, quer ainda na sua eficiência de extinção de fluorescência em meio membranar. Assim, embora normalmente se assuma que o KI actua como agente de extinção de fluorescência apenas em ambientes hidrofílicos, existem fortes argumentos a favor da sua capacidade de penetração membranar e extinção de fluorescência de fluoróforos membranares, tendo-se sugerido a formação de um gradiente de concentração em função da profundidade membranar. Esta ideia é sustentada pelo coeficiente de partição lípido/fase aquosa do KI em vesículas de EPC, correspondente a um valor de $K_p = 6 \pm 4$, e também, pelos estudos de extinção de fluorescência levados a cabo com o iodeto relativamente às sondas de ácidos n-9-antioiloxiesteáricos (2, 3, 6, 7, 9, 10, 12-AS) entre outras sondas membranares, em que se evidenciou a sua capacidade de extinção de fluorescência em ambientes membranares ^(39, 134). Paralelamente, dada a natureza de ião negativo, a extinção de fluorescência pelo iodeto é susceptível de modulação pelas cargas eléctricas envolventes do fluoróforo, com os ambientes ricos em cargas negativas a resultarem numa diminuição da eficiência de extinção de fluorescência pelo iodeto, enquanto que a presença de cargas positivas desencadeia aumentos. Assim, a

acessibilidade definida pelo K_{SV} que genericamente depende do impedimento estérico, no caso de agentes de extinção de fluorescência com carga efectiva, como o iodeto, depende também das cargas locais em torno do fluoróforo ⁽¹³³⁾.

Quanto à acrilamida, trata-se de um agente de extinção de fluorescência não carregado, de características polares e hidrossolúvel, do qual não se espera que permeie a zona hidrofóbica das bicamadas. A experiência tem confirmado tal previsão já que não se verifica extinção de fluorescência pela acrilamida à sonda membrana 12-AS ⁽³⁹⁾. A acrilamida é frequentemente utilizada em estudos de extinção de fluorescência envolvendo proteínas pois é-lhe reconhecida elevada eficiência de extinção de fluorescência dos grupos indol proteicos por via predominantemente colisional. A sua eficiência de extinção de fluorescência das proteínas demonstra-se independente da polaridade do microambiente que envolve os triptofanos, revelando-se condicionada, apenas, por possíveis impedimentos estéricos inerentes à estrutura proteica ⁽¹³⁵⁾.

4.2.1.2 Extinção de fluorescência em estruturas organizadas

São numerosos os estudos envolvendo a técnicas de extinção de fluorescência aplicados a meios como micelas, monocamadas, vesículas lipossómicas, membranas naturais, células e proteínas e que contribuem para a compreensão das suas propriedades dinâmicas e estruturais.

O fundamento para o método de extinção de fluorescência em estruturas organizadas envolve um fluoróforo solubilizado no interior da estrutura ou adsorvido à sua superfície, cuja fluorescência é desactivada pela presença de um soluto que pode estar partilhado entre a fase organizada e o solvente. A velocidade e/ou extensão com que o agente de extinção penetra na estrutura, bem como a velocidade de difusão do fluoróforo, vão determinar a cinética do processo de extinção ⁽¹¹⁶⁾.

Embora em sistemas heterogéneos se apliquem geralmente os modelos desenvolvidos para as soluções, essa transposição deverá ser efectuada com ponderação, pois apesar de uma molécula relativamente pequena poder ter um comportamento na membrana semelhante ao que teria em solução homogénea, o mesmo não se verifica para moléculas de maiores dimensões com uma orientação definida que deve mover-se apenas transversalmente no plano da membrana ⁽¹³⁶⁾.

Por outro lado, tem-se ainda de levar em consideração que a bicamada lipídica é constituída por uma sucessão de microambientes distintos, e que diferenças ao nível das eficácias relativas de desactivação para uma série de sondas de fluorescência podem

apenas reflectir a influência de um gradiente de microviscosidade desde a superfície até ao centro da bicamada.

Implicações matemáticas na análise de resultados

Os resultados de um processo de extinção de fluorescência dinâmica ou colisional são sempre analisados de acordo com a equação clássica de Stern-Volmer (3.0). Porém, no caso do agente de extinção se particionar entre a fase aquosa e a fase membrana, a extinção de fluorescência é determinada apenas pela sua concentração na fase lipídica e a equação de Stern-Volmer estará então relacionada com a concentração local de agente de extinção:

$$F_0/F - 1 = K_D [Q]_m \quad (5.0)$$

sendo $[Q]_m$ a concentração efectiva do agente de extinção na fase membrana. $[Q]_m$ é calculado a partir da concentração total de agente de extinção $[Q]_t$ através de um factor de correcção C_f , $[Q]_m = [Q]_t \times C_f^{(130)}$. O factor de correcção é dado pela expressão:

$$C_f = \left(1 - \frac{K_p \gamma_L [L]}{1 - \gamma_L [L] + K_p \gamma_L [L]} \right) - \frac{K_p}{1 - \gamma_L [L]} \quad (5.1)$$

em que γ_L é o volume molar do lípido, $[L]$ é a concentração molar do lípido e K_p é o coeficiente de partição do agente de extinção.

4.2.1.3 Extinção de fluorescência de proteínas

Consequência da elevada sensibilidade do triptofano ao seu meio envolvente, a fluorescência intrínseca das proteínas constitui actualmente uma importante ferramenta de estudo da estrutura, funcionamento e interacção das proteínas com o meio que as envolve. Através das alterações ao espectro de emissão de uma proteína é possível detectar-se desde alterações conformacionais, associação/dissociação de subunidades constituintes, ligação de substratos, desnaturação proteica entre outras situações.

A extinção de fluorescência tem sido amplamente utilizada como forma de determinar a localização dos triptofanos na disposição conformacional das proteínas. A base comum aos diversos procedimentos consiste em recorrer a agentes de extinção hidrossolúveis que dificilmente penetram numa matriz proteica hidrofóbica, em que, portanto, a ocorrência de

extinção de fluorescência é reveladora de uma localização dos triptofanos relativamente exposta à fase aquosa. Paralelamente, o facto de os agentes de extinção de fluorescência de características polares se mostrarem eficazes na extinção de fluorescência apenas de triptofanos periféricos, realça também a utilidade desta técnica na resolução de espectros de emissão compostos resultantes da presença de triptofanos com diferentes localizações, situação frequente na análise da fluorescência de proteínas.

O pleno conhecimento das componentes de um espectro de fluorescência de uma proteína permite a sua utilização na análise de resultados de estudos posteriores que exploram desde a componente estrutural, até aos parâmetros de funcionamento e estabilidade e interacção com eventuais substratos.

4.2.1.4 Transferência de Energia de Ressonância (RET)

A transferência de energia de ressonância constitui outro importante processo que ocorre no estado excitado do fluoróforo, e que se verifica sempre que o espectro de emissão do fluoróforo (dador) se sobrepõe ao espectro de absorção de uma outra molécula presente em solução (aceitador).

Um processo de transferência de energia de ressonância não é o resultado da absorção da emissão do dador pelo aceitador, mas antes a relação entre o dador e o aceitador que é estabelecida através de interacções dipolo-dipolo no estado excitado. Assim, a eficiência de transferência de energia é determinada pela distância entre dador e aceitador e pela extensão da sobreposição espectral (Figura I-21) descrita em termos de distância de Förster (R_0)⁽³⁹⁾.

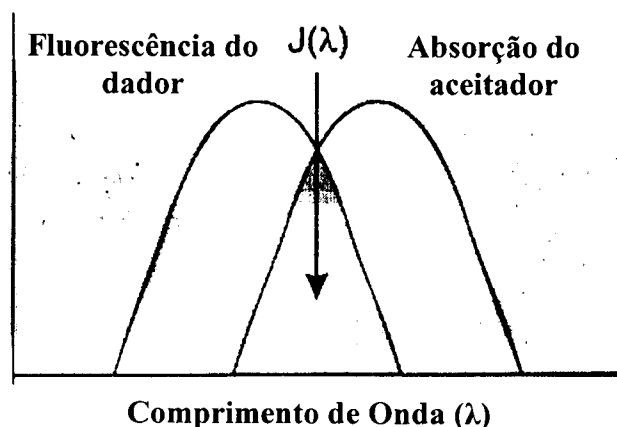


Figura I-21: Representação esquemática da sobreposição espectral característica de uma situação de RET.

A grande utilidade da RET reside nesta acentuada dependência da eficiência do processo com a distância entre o dador e o aceitador, o que permite a determinação de

distâncias à escala molecular, de concentrações superficiais, de associações/ligações, agregação e heterogeneidade de distribuição de componentes em ambientes membranares (41).

As distâncias críticas de transferência estão normalmente compreendidas entre os 15-60 Å, sendo comparáveis à espessura das membranas biológicas. Assim, os fenómenos de transferência de energia de ressonância têm sido utilizados como indicadores de proximidade para se estimar distâncias entre dador e aceitador e possibilitando inferir sobre a localização de fármacos recorrendo a sondas de fluorescência de localização conhecida (39, 137). Mais uma vez se destaca que as sondas de fluorescência poderão ser intrínsecas ao sistema, como acontece com as proteínas membranares, nesses casos, para além da definição da localização membranar do fármaco, é possível inferir sobre a sua proximidade ou mesmo interação com a própria componente proteica.

A teoria referente à transferência de energia de ressonância é complexa mesmo nos casos mais simples que incluem dadores e aceitadores em posições fixas e portanto caracterizadas por uma distância definida. A complexidade aumenta significativamente em sistemas em solução onde a distribuição de distâncias entre dador e aceitador são aleatórias verificando-se que ocorre maior transferência de energia para pares de dador/aceitador mais próximos entre si. Neste tipo de situação, a concentração de aceitadores adquire grande importância pois determina a proximidade entre dador e aceitador (39, 127). Apesar da complexidade inerente à teoria de RET, existem alguns conceitos e relações matemáticas que são comuns às diversas situações e que importa salientar para uma melhor definição do processo.

A constante de velocidade da transferência de energia (k_T) é determinada em função da distância dador/aceitador (R) e, entre outros parâmetros, pelo grau de sobreposição espectral descrito em termos de distância crítica de transferência ou raio de Förster (R_0) pela equação:

$$k_T = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{R} \right)^6 \quad (\text{s}^{-1}) \quad (6.0)$$

sendo R a distância entre o dador e o aceitador e t_D o tempo de semi-vida do dador na ausência do aceitador.

A eficiência de transferência de energia para um par dador/aceitador, separados por uma distância R , é dada por:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6} \quad (6.1)$$

sendo o raio de Förster calculado através da equação:

$$R_0 = 0,211 \left[K^2 n^{-4} \phi_0 J(\lambda) \right]^{\frac{1}{6}} \quad (\text{\AA}) \quad (6.2)$$

em que K^2 é o factor que descreve a orientação espacial relativa dos dipolos de transição do dador e aceitador, que é igual a 2/3 no limite dinâmico isotrópico, F é o rendimento quântico de fluorescência do dador na ausência do aceitador (este valor é de 0,13 para o triptofano), n é o índice de refração do meio, que se assume ser 1,4 para moléculas incorporadas em membranas biológicas e $J(\lambda)$ expressa o grau de sobreposição entre o espectro de emissão do dador e o de absorção do aceitador e é dado pela expressão:

$$J(\lambda) = \int_0^{\infty} F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (6.3)$$

em que $F_D(\lambda)$ é o espectro de fluorescência normalizado do dador, $\varepsilon(\lambda)$ é o coeficiente de extinção molar ($\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) do aceitador ao comprimento de onda λ .

A eficiência de transferência de energia (teórica) é calculada a partir do grau de extinção de fluorescência do dador induzido pela presença do aceitador, de acordo com a seguinte equação:

$$E = 1 - \frac{I_{DA}}{I_D} = \frac{\int_0^{\infty} I_{DA}(t) dt}{\int_0^{\infty} I_D(t) dt} \quad (6.4)$$

onde I_{DA} corresponde ao decaimento da intensidade de fluorescência do dador na presença do aceitador, I_D corresponde ao decaimento da intensidade de fluorescência do dador na ausência do aceitador.

Para uma distribuição bidimensional e aleatória de aceptadores a equação que descreve o decaimento de fluorescência do dador é ⁽³⁹⁾:

$$I_{DA}(t) = \exp \left[-\frac{t}{\tau_D} - c \left(\frac{t}{\tau_D} \right)^{\frac{1}{3}} \right] \quad (6.5)$$

com

$$c = \Gamma \left(\frac{2}{3} \right) \pi R_0^2 n \quad (6.6)$$

onde n é a concentração superficial de aceitadores e Γ representa a função gama completa.

A eficiência de transferência de energia em estado estacionário (experimental) é determinada a partir da intensidade de fluorescência relativa do dador na ausência (F_D) e na presença (F_{DA}) do aceitador:

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} \quad (6.7)$$

Os valores de F_{DA} são obtidos após correcção das intensidades de fluorescência uma vez que o aceitador absorve ao comprimento de onda de excitação do dador⁽¹³²⁾.

Em grande parte das situações de RET a distribuição de aceitadores em torno do dador não tem contornos aleatórios, sofrendo influências quer de uma localização espacial definida do dador, ou por divisão em diferentes populações de aceitadores eles próprios com posicionamentos distintos em relação ao dador, ou por particularidades estruturais da estrutura em que se insere a molécula dadora que delimitam o acesso dos aceitadores, ou mesmo pelo estabelecimento de interacção/ligação entre o dador e aceitadores. As situações referidas constituem apenas alguns exemplos das inúmeras situações particulares de RET que podem ocorrer, o que salienta a complexidade deste tipo de análise e a necessidade da criação de modelos específicos para cada situação em particular. Assim, numa primeira abordagem a uma situação de RET, e supondo uma análise segundo os parâmetros mais simples, a comparação das eficiências de transferência de energia teóricas e experimentais resulta, normalmente, numa notória disparidade dos dois traçados gráficos (Figura I-22).

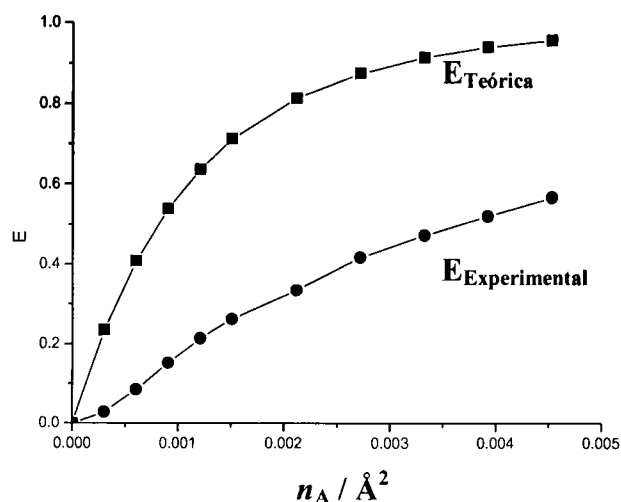


Figura I-22: Eficiência de transferência de energia em função da quantidade de aceitador. Comparação das eficiências teóricas e experimentais.

Na tentativa de justificar as disparidades entre os valores previstos teoricamente e os experimentais são criados diferentes modelos fundamentados na situação particular em análise.

Constantes de ligação a partir de determinações de RET: Proteínas membranares e seus substratos

Em algumas situações de RET, a disparidade das eficiências de transferência de energia teórica e experimental encontram suporte teórico em modelos que contabilizam um contributo proveniente duma ligação entre dador e aceitador. Nessa situação, uma análise detalhada da extensão do efeito de extinção de fluorescência do dador induzido em presença do aceitador permite o cálculo de uma constante de ligação (K_{lig}) entre estas duas moléculas.

Em determinações em que o dador se encontra em ambiente membranar (caso das proteínas membranares), e aí desenvolve a sua interação, o RET verificado é o resultado de duas contribuições distintas: dos aceptadores que particionam na bicamada lipídica e que consequentemente se encontram em maior concentração em torno do dador, e dos aceptadores em solução, já que a eficiência de RET se mantém a distâncias que podem ir até $\sim 100 \text{ \AA}$, tudo dependendo do raio de Förster entre o par dador-aceitador⁽³⁹⁾. Apenas a primeira das referidas contribuições se mostra relevante para a determinação de uma eventual constante de ligação entre dador e aceitador, assim, alguns formalismos relativos à eliminação da contribuição da fracção de aceptadores não membranares para os valores experimentais obtidos, têm de ser considerados aquando do cálculo das eficiências de RET.

Os moldes a seguir para eliminar esta contribuição serão específicos de cada sistema em estudo, sendo desenvolvidos de acordo com as particularidades geométricas de cada sistema. De acordo com estes pressupostos, o decaimento de fluorescência do dador em presença dos aceitadores ($i_{DA}(t)$) é descrito por:

$$i_{DA}(t) = \gamma \cdot i_D(t) \cdot \rho_{ligado}(t) \cdot \rho_{livre}(t) + (1 - \gamma) \cdot i_D(t) \cdot \rho_{livre}(t) \quad (6.8)$$

em que i_{DA} e i_D representam os decaimentos de fluorescência em presença e na ausência de aceitadores, γ representa a fracção de dador ligado ao aceitador e ρ_{ligado} constitui a contribuição, para a transferência de energia total, dos aceitadores ligados aos dadores e ρ_{livre} representa a contribuição, para a transferência de energia total, dos aceitadores livres em solução e aleatoriamente distribuídos por planos distintos (i) daquele em que se encontra o dador⁽¹³⁸⁾.

$$\rho_{livre} = \prod_i \left[\exp \left(-2 \cdot n_2 \cdot \pi \cdot w_i^2 \cdot \int_0^{\frac{w_i}{\sqrt{w_i^2 + R_e^2}}} \frac{1 - \exp(-t \cdot b_i \cdot \alpha^6)}{\alpha^3} d\alpha \right) \right] \quad (6.9)$$

onde $b_i = (R_0^2/w_i)^2 \tau_D^{-1/3}$, n_2 representa a densidade de aceitador em cada folheto da bicamada lipídica, w_i designa as distâncias entre o plano dos dadores e o plano dos aceitadores e R_e representa o raio de exclusão do dador (área em torno do dador da qual os aceitadores estão excluídos). Este raio de exclusão é particularmente importante em estudos de RET envolvendo pares proteína-ligando, com proteínas de dimensões comparáveis ao raio de Förster para o respectivo par.

Para se proceder ao cálculo das contribuições de ρ_{livre} e ρ_{ligado} para o valor total de RET torna-se necessário formular um modelo que se ajuste ao par em estudo e que seja capaz de descrever as posições dos dadores e aceitadores na bicamada lipídica. Nesse contexto irá proceder-se à descrição do modelo assumido para a interacção OmpF/Ciprofloxacina (CP).

No caso concreto da porina OmpF, esta proteína tem os seus aminoácidos aromáticos localizados em duas faixas que circundam as extremidades de cada um dos poros na interface lípido/água, distando 25 Å uma da outra⁽¹³⁹⁾. Os dois triptofanos (Trp⁶¹ e Trp²¹⁴) presentes em cada um dos seus monómeros têm localização na mesma faixa aromática

assumindo-se que se encontram no mesmo plano, e a cerca de 12,5 Å do centro da bicamada lipídica.

Por sua vez, a incorporação da CP em lipossomas, revela uma localização da QN ao nível da região das cabeças polares dos fosfolípidos ⁽¹⁴⁰⁾, o que significa que se tratando de lipossomas de DMPC terá uma localização a cerca de 18 Å do centro da bicamada. Assim, para os cálculos de RET esta constituirá a posição no plano dos aceitadores, assumindo-se os valores de 5,5 e 30,5 Å para w_1 e w_2 , respectivamente (Figura I-23). O modelo em causa assume, ainda, que apenas a fracção de CP ligada a OmpF poderá estar presente na área da bicamada em que se insere OmpF.

I) Contribuição para a transferência de energia OmpF da fracção livre de CP
(ρ_{livre}):

Para o Trp⁶¹, de localização na interface do trímero o raio de exclusão para a fracção de CP livre (R_e) assume o valor de 30 Å que corresponde ao valor aproximado do diâmetro de um monómero de OmpF no plano da bicamada ⁽¹⁴¹⁾ (Figura I-23B). Para o Trp²¹⁴ de localização na periferia do trímero a distribuição da fracção de CP livre em seu redor terá uma distribuição cilíndrica e assimétrica. Esta diferença na forma como os aceitadores livres se distribuem relativamente, a cada um dos triptofanos e portanto na diferente forma como cada um dos Trp é afectado, só se torna evidente recorrendo-se a simulações de RET que contabilizem ρ_{livre} relativamente a cada um dos triptofanos.

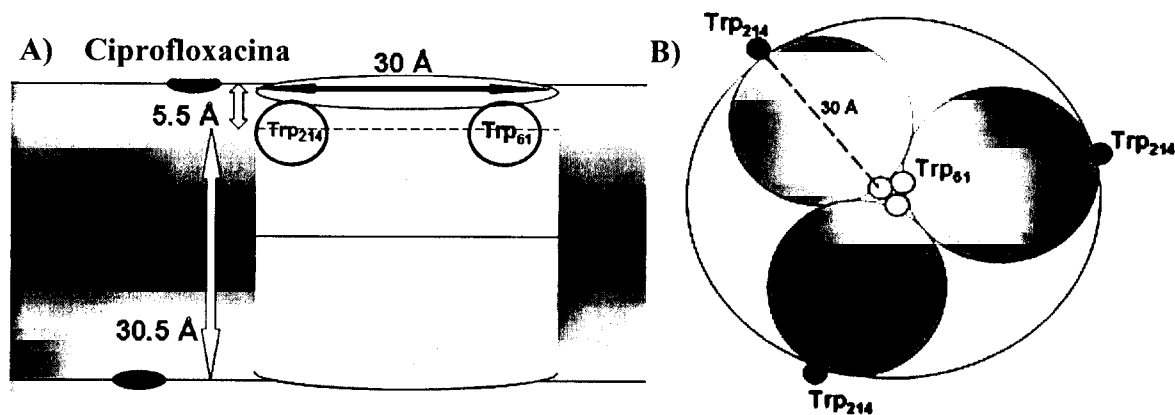


Figura I-23: Representação esquemática da localização dos dadores e aceitadores relativamente ao plano membranar e na estrutura proteica. A) Posição dos dadores (Trp²¹⁴ e Trp⁶¹) e aceitadores (Ciprofloxacina) na bicamada de DMPC. No modelo estipulado cada um dos monómeros de OmpF é aproximado à forma geométrica de cilindro com um raio de 30 Å. B) Visão de topo do trímero de OmpF, representado de acordo com os pressupostos do modelo de RET assumido. Adaptado da referência [142].

Para o Trp⁶¹ a contribuição para o RET da fracção livre é obtida por simples substituição na equação (6.9) de $i = 2$, $w_1 = 5,5 \text{ \AA}$, $w_2 = 30,5 \text{ \AA}$ e $R_e = 30 \text{ \AA}$. Para o Trp²¹⁴ existe ainda uma grande fracção da bicamada que está ocupada pela proteína e portanto inacessível aos aceitadores. Contudo, o arranjo da estrutura proteica em torno deste Trp já não é simétrico como acontecia com o Trp⁶¹, e portanto o cálculo da contribuição de energia transferida para a fracção livre de CP adquire contornos distintos:

$$\rho_{\text{livre}}(t) = \prod_i \left[\exp \left\{ -2\pi n_2 w_i^2 \left[\int_{w_i/\sqrt{w_i^2 + R_d^2}}^{w_i/\sqrt{w_i^2 + R_p^2}} \left\{ 1 - \exp \left[\left(-\frac{t}{\tau_D} \right) \left(\frac{R_0}{w_i} \right)^6 \alpha^6 \right] f(\alpha) \right\} d\alpha - \int_{w_i/\sqrt{w_i^2 + R_p^2}}^1 \exp \left[\left(-\frac{t}{\tau_D} \right) \left(\frac{R_0}{w_i} \right)^6 \alpha^6 \right] f(\alpha) \alpha^{-3} d\alpha \right\} \right] \right] \quad (6.10)$$

Portanto, nesta situação ρ_{livre} representa a contribuição de RET para o decaimento da fluorescência do dador localizado na periferia da proteína de raio R_p e devida à presença de aceitadores distribuídos aleatoriamente em i planos distintos (Para detalhes da derivação desta componente e da função $f(a)$ consultar referência 142).

A aplicação das equações (6.4), (6.8), (6.10) permitirá obter as eficiências teóricas da RET para a fracção de aceitadores de distribuição aleatória.

II) Contribuição para a transferência de energia OmpF da fracção de CP especificamente ligada à estrutura proteica (ρ_{ligada}):

Para se quantificar a contribuição relativa à fracção de CP especificamente ligada a OmpF para a RET total, torna-se necessário relacionar a constante de ligação do antibiótico a OmpF (K_{PC}) com o factor γ (fracção de OmpF ligada à CP):

$$\gamma = \frac{\left[(1 + [\text{OmpF}] \cdot K_{PC} + [\text{CP}] \cdot K_{PC}) \pm \sqrt{(-1 - [\text{OmpF}] \cdot K_{PC} - [\text{CP}] \cdot K_{PC})^2 - 4K_{PC}^2 [\text{OmpF}][\text{CP}]} \right]}{2 \cdot K_{PC} [\text{OmpF}]_{\text{Total}}} \quad (6.11)$$

Na equação acima $[\text{OmpF}]_{\text{Total}}$ e $[\text{OmpF}]$ representam, respectivamente, as concentrações total e livre de OmpF, e $[\text{CP}]$ é a concentração de CP livre. Assume-se que

apenas se formam complexos OmpF/CP na proporção 1:1 de acordo com o demonstrado por estudos prévios⁽¹⁴³⁾.

A ligação da CP a OmpF irá afectar os diferentes triptofanos do trímero de forma distinta, pois as respectivas distâncias entre o antibiótico e cada um dos triptofanos serão, obviamente, diferentes. Consequentemente, também para o cálculo de ρ_{ligado} terá de se considerar duas contribuições distintas relativas ao Trp²¹⁴ e ao Trp⁶¹. Assumindo que pelo menos um dos triptofanos de OmpF é parte integrante de um hipotético local de ligação com a molécula de CP, e portanto sofre total extinção da sua fluorescência, e que há apenas uma única molécula CP ligada a OmpF por cada evento analisado, podem sujeitar-se a análise duas hipóteses distintas:

I) O local de ligação da CP tem localização próxima da zona central do trímero, e por ligação do antibiótico ocorre total extinção de fluorescência dos três Trp⁶¹ de OmpF (distância do Trp⁶¹ à CP $\ll R_0$) (Figura I-24A), restando apenas a fluorescência dos três Trp²¹⁴ localizados a cerca de 30 Å (d_1 , raio do trímero) da molécula de CP;

II) o local de ligação da CP é próximo da interface proteína / lípido (Figura I-24B), a sua ligação à proteína irá desencadear a extinção da fluorescência de um dos Trp²¹⁴, ficando o antibiótico localizado a cerca de 30 Å (d_1') dos Trp⁶¹ e a 52 Å (d_2) dos outros dois Trp²¹⁴;

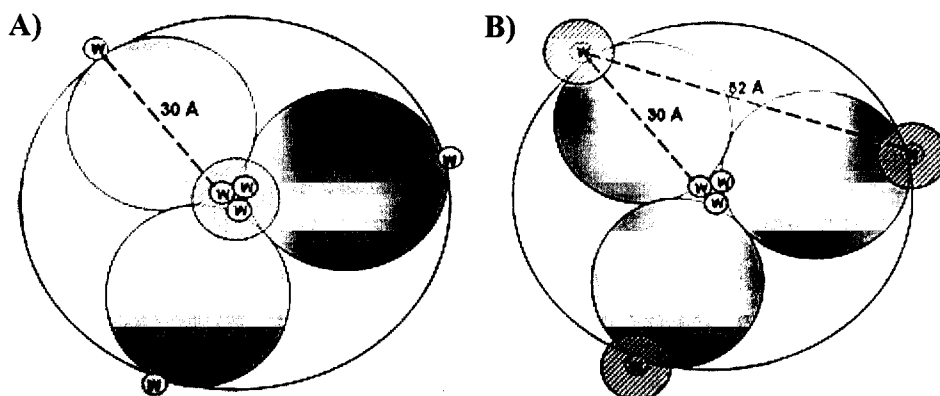


Figura I-24: Representação esquemática do trímero de OmpF com destaque para os possíveis locais de ligação da CP, para cada uma das hipóteses formuladas. A) Hipótese I, local de ligação da CP próximo da interface do trímero, completa extinção da fluorescência dos Trp⁶¹; B) Hipótese II, local de ligação da CP na periferia do canal, próximo de um dos Trp²¹⁴. Adaptado da referência [142].

Assim, a contribuição para o RET da fracção ligada, será obtida, respectivamente, para cada uma das hipóteses pelas seguintes expressões:

Hipótese I

$$\rho^I_{\text{Ligado (Trp}^{214})}(t) = \exp\left(-\frac{t}{t_D} \cdot \left(\frac{R_0}{d_1}\right)^6\right) \quad (6.12)$$

Hipótese II

$$\rho^{II}_{\text{Ligado (Trp}^{61})}(t) = \exp\left(-\frac{t}{t_D} \cdot \left(\frac{R_0}{d_1'}\right)^6\right) \quad (6.13)$$

$$\rho^{II}_{\text{Ligado (Trp}^{214})}(t) = \exp\left(-\frac{t}{t_D} \cdot \left(\frac{R_0}{d_2}\right)^6\right) \quad (6.14)$$

Através do exemplo exposto depreende-se que esta metodologia é adequada não só ao exemplo concreto que se descreveu, mas também a outras proteínas similares (as porinas da membrana externa bacteriana apresentam elevada homologia estrutural), tudo dependendo da aplicação das devidas adaptações a eventuais diferenças na geometria estrutural proteica.

4.2.2 Anisotropia de Fluorescência

As medições de anisotropia integram a vasta gama das aplicações bioquímicas da técnica de fluorescência, fornecendo informações que vão desde a fluidez de membranas, até à localização membranar de proteínas e fármacos.

A anisotropia de fluorescência fundamenta-se na determinação do grau de polarização da luz emitida por um fluoróforo, após excitação por um feixe de luz também polarizada, estando directamente relacionada com o grau de difusão rotacional do fluoróforo durante o tempo de vida do seu estado excitado, o qual, por seu lado, depende das características do meio onde está integrado.

O fenómeno de anisotropia de fluorescência tem por base o princípio da excitação fotoselectiva de fluoróforos por luz polarizada, sendo determinada pelo grau de polarização da luz emitida ⁽³⁹⁾. Ou seja, os fluoróforos absorvem preferencialmente fótons cujos vectores eléctricos estão alinhados paralelamente aos seus momentos de transição,

que têm uma orientação definida relativamente aos eixos moleculares. Em soluções isotrópicas, os fluoróforos encontram-se orientados aleatoriamente. Após excitação com luz polarizada ocorre excitação selectiva das moléculas de fluoróforo cujo dipolo de transição é paralelo ao vector eléctrico de excitação. Esta excitação selectiva resulta numa população parcialmente orientada de fluoróforos excitados, e consequentemente numa emissão de fluorescência parcialmente polarizada ⁽⁴¹⁾. Contudo, diversos factores contribuem para a despolarização da fluorescência emitida, de entre os quais se destaca a difusão rotacional dos fluoróforos por se tratar de uma das causas mais comuns de despolarização (Figura I-25). Assim, os valores de anisotropia reflectem o deslocamento angular médio de um fluoróforo que ocorre entre a absorção e a emissão subsequente de um fóton ⁽³⁹⁾.

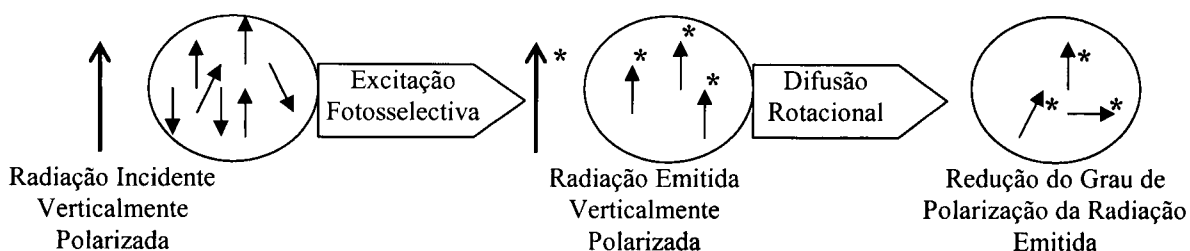


Figura I-25: Despolarização da radiação emitida por difusão rotacional.

Quando um fluoróforo é excitado com luz verticalmente polarizada (segundo uma coordenada arbitrária), a despolarização da emissão pode ser avaliada interpondo entre a amostra e o fotomultiplicador (análise) um polarizador orientado com a mesma direcção (vertical) ou com direcção ortogonal (horizontal) à do polarizador de excitação. Nestas condições, as intensidades de fluorescência colhidas no fotomultiplicador, I_{VV} e I_{VH} , respectivamente, dependem da: orientação relativa dos vectores momento dipolar no estado fundamental ($\uparrow$) e no estado excitado ($\uparrow^*$) (Figura I-25), bem como da redistribuição de orientações do vector momento de transição para a emissão relativamente à direcção de observação. Assim, a anisotropia (r) é definida pela seguinte relação entre as intensidades de fluorescência relativas:

$$r = \frac{I_{VV} - I_{VH} \cdot G}{I_{VV} + 2I_{VH} \cdot G} \quad (7.0)$$

Uma vez que grande parte das determinações de anisotropia é efectuada em estado estacionário, a anisotropia pode ainda ser interpretada com base na microviscosidade do meio através da aplicação da equação de Perrin:

$$\frac{r_0}{r} = 1 + \frac{\tau}{\theta} \quad \text{sendo} \quad (7.1)$$

$$\theta = \frac{\eta V}{RT} \quad (7.2)$$

em que r_0 é o valor de anisotropia que se esperaria na ausência de rotação, τ o tempo de vida do fluoróforo, θ é o tempo de correlação rotacional do fluoróforo, sendo η a microviscosidade do meio, V o volume da unidade rotacional, R a constante dos gases perfeitos e T a temperatura absoluta.

Considerando as moléculas como esferas em solução homogénea, Perrin demonstrou que a anisotropia de fluorescência em estado estacionário, r , está relacionada com o tempo de vida do fluoróforo (τ) que contabiliza o tempo característico para a emissão, e com a fluidez do meio (considerado contínuo e isotrópico), que quantifica a mobilidade do mesmo ^(39, 127). Ou seja, a luz polarizada excita selectivamente momentos dipolares com a mesma orientação que a sua, os quais irão emitir luz durante o seu tempo de vida no estado excitado (τ). Inicialmente, a luz emitida tem polarização paralela à luz incidente e portanto o valor de r é elevado. Através da difusão rotacional, a orientação dos dipolos das moléculas a emitir torna-se progressivamente mais desordenada e o valor da anisotropia vai decrescendo. Se assumirmos os fluoróforos em meio isotrópico, então a distribuição final também será isotrópica originando-se valores nulos de anisotropia. Porém, num meio não isotrópico, quanto maior a viscosidade do meio (maiores valores de θ) maior será a preservação da quantidade de anisotropia inicialmente criada, originando-se valores elevados de anisotropia final ⁽¹⁴⁴⁾.

A anisotropia mede, portanto, a quantidade de rotação molecular durante o tempo de vida do estado excitado da molécula, sendo sensível à rigidez do meio molecular bem como à forma e tamanho do fluoróforo ⁽⁴¹⁾. Assim, em última análise, o parâmetro ajustável da equação, a anisotropia (r), é função da microviscosidade “sentida” pelos fluoróforos na pseudo fase lipídica, e está directamente relacionada com as interacções com as moléculas existentes na sua vizinhança. Este método revela-se um dos mais

indicados para a detecção de alterações membranares decorrentes da inclusão de moléculas externas na sua organização estrutural.

Os resultados de anisotropia de fluorescência (r) são sempre analisados pela equação (7.0):

$$r = \frac{I_{VV} - I_{VH} \cdot G}{I_{VV} + 2I_{VH} \cdot G} \quad (7.0)$$

sendo I_{VV} e I_{VH} as intensidades de luz medidas paralela e perpendicularmente ao feixe de excitação polarizado na vertical e G um factor de correcção que corresponde à sensibilidade do sistema de detecção para a luz polarizada, na vertical e horizontal. O factor de correcção G é definido pela razão entre os componentes verticais e horizontais quando a luz de excitação está polarizada na direcção horizontal ⁽³⁹⁾:

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad (7.3)$$

Em ambiente membranar, a anisotropia depende da composição química e da fase em que se encontra a membrana. Consequentemente, as medidas de anisotropia são frequentemente usadas no estudo das propriedades e interacções das diferentes moléculas com as membranas. Na realidade, em ambiente membranar, os valores de anisotropia não reflectem apenas a velocidade de rotação da sonda na membrana, mas antes revelam a extensão da restrição imposta à rotação da sonda pelo ambiente anisotrópico da membrana ⁽³⁹⁾.

As sondas ligadas a membranas apresentam um comportamento particular, isto é, as anisotropias destas sondas não decaem até valores nulos. Este comportamento ocorre, em contraste com as sondas em soluções isotrópicas, porque nas membranas as sondas não podem rodar livremente (Figura I-26). A extensão da rotação é frequentemente limitada pelo ambiente anisotrópico da membrana ⁽³⁹⁾.

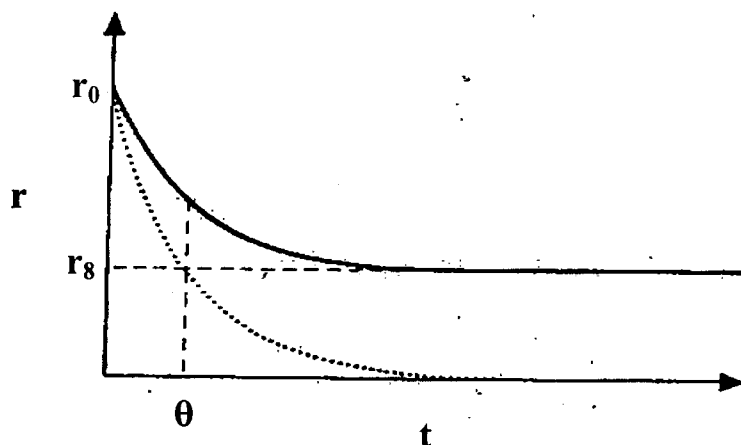


Figura I-26: Variação da anisotropia de fluorescência em função do tempo. Linha a tracejado corresponde à lei de Perrin. Os símbolos r_0 , r_8 e θ correspondem, respectivamente, às designações de valor máximo de anisotropia (ausência de difusão rotacional), valor limite de anisotropia (coerente com uma situação de ambiente anisotrópico) e tempo de correlação rotacional. Adaptado da referência [144].

Para moléculas em ambiente membranar, o valor final da anisotropia de fluorescência (r_8) fornece informação sobre a ordem estrutural da membrana, enquanto que o tempo de correlação rotacional (θ) irá facultar informação sobre as propriedades cinéticas como a microviscosidade (η). Assim, anisotropias diferentes de zero podem ser interpretadas em termos de parâmetro de ordem (S) da membrana^(39, 144):

$$S^2 = \frac{r_\infty}{r_0} \quad (7.4)$$

em que, para sondas membranares como o DPH (e seus derivados) com orientação paralela à das cadeias hidrocarbonadas dos lípidos, r_8 é definido por⁽¹⁴⁴⁾:

$$r_\infty = \frac{9}{8} r - \frac{1}{20} \quad (7.5)$$

Expressão válida a uma dada temperatura constante e assumindo a $\tau/\theta = 8$ para o DPH inserido em fase lipídica⁽¹⁴⁴⁾.

4.2.2.1 Sondas de Fluorescência: sondas de fluidez ou de anisotropia de fluorescência

A fluorescência emitida por um determinado fluoróforo contém informações relacionadas não apenas com o fluoróforo, mas também relativas às moléculas que o rodeiam. Desta forma, o fluoróforo quando posicionado em determinado local de interesse e depois de devidamente conhecidas as suas características quanto à emissão de fluorescência, pode ser utilizado na obtenção de informação sobre as ocorrências do meio envolvente, sendo então designado como sonda de fluorescência.

As sondas permitem obter uma grande variedade de informações através da análise dos seus espectros de excitação, de emissão, do seu rendimento quântico de fluorescência, do tempo de vida e da polarização. Assim, o conhecimento adequado dos processos de fluorescência permite obter informações sobre a fluidez membranar, a viscosidade e polaridade dos solventes, perturbações membranares, a distância entre cromóforos, etc. (127).

Nos sistemas biológicos distinguem-se dois tipos de sondas, as sondas intrínsecas, tais como proteínas e polipeptídeos contendo resíduos de triptofano e tirosina (fluoróforos naturais do sistema), e as sondas extrínsecas, moléculas fluorescentes adicionadas ao sistema.

A utilização de um determinado fluoróforo como sonda de fluorescência extrínseca em sistemas de organização membranar implica que o fluoróforo obedeça a alguns requisitos: a) possuir um elevado coeficiente de partição membrana/solução aquosa, de modo a que a sua incorporação membranar seja praticamente completa, ou então apresentar um rendimento quântico em fase aquosa praticamente nulo; b) ter um valor de rendimento quântico na membrana elevado, para que a razão sinal/ruído seja aceitável; c) possuir bandas de absorção e de fluorescência distintas das do sistema membranar em estudo; d) ser sensível à propriedade membranar que se pretende estudar; e) a sua integração membranar não deverá provocar alterações na normal organização da bicamada; f) deve apresentar-se com elevado grau de pureza; g) não deve sofrer fotodegradação ou fotodimerização durante a excitação; h) devem ter localização membranar fixa e conhecida (43, 127).

Actualmente existe uma vasta gama de compostos utilizados como sondas de fluorescência nos mais diversos estudos de entre os quais se referem as moléculas de DPH (1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno), o TMA-DPH (1-(4-trimetilamoniofenil)-6-fenil-1,3,5-

hexatrieno), o pireno, o ANS (ácido 8-anilino-1-naftalenossulfónico) e as sondas da série n-AS (ácido n-antioiloxiestearico).

A avaliação da fluidez membranar a partir de medições de anisotropia de fluorescência implica necessariamente a utilização de moléculas lipossolúveis cuja estrutura química permita a sua integração membranar, sendo o movimento destes fluoróforos condicionado pelo microambiente que os envolve⁽¹²⁷⁾. De entre as moléculas capazes de ser usadas como sondas de fluidez ou de anisotropia de fluorescência, destaca-se: o DPH e o TMA-DPH (Figura I-27) por serem as mais frequentemente utilizadas.

O DPH tornou-se nos últimos anos o marcador mais utilizado na estimativa da microviscosidade da região hidrocarbonada membranar. A emissão de fluorescência do DPH apenas acontece em ambientes hidrofóbicos e a sua partição nas membranas fosfolipídicas acontece quer no estado de gel, quer em estado de cristal líquido⁽¹⁴⁵⁾.

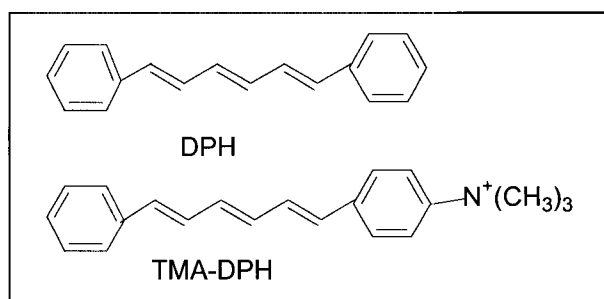


Figura I-27: Fórmula de estrutura do DPH e do TMA-DPH.

De entre as diversas razões que justificam o uso generalizado do DPH, destaca-se o seu elevado coeficiente de extinção molar ($80000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), que permite a análise de soluções bastante diluídas; a sua constância de grau de polarização entre os 320 e 380 nm, o que permite a escolha do comprimento de onda de excitação que melhor se adequa à situação; as suas rotações serem provavelmente isotrópicas; as rotações em torno do maior eixo da molécula serem rápidas sem deslocar o momento de transição e portanto, sem alterarem a despolarização e, por último por permitir uma nítida visualização da transição de fase das membranas⁽³⁹⁾.

Também o TMA-DPH, que é um derivado do DPH obtido por introdução de um grupo trimetilamónio catiónico num dos anéis do DPH, é uma sonda anfipática muito utilizada, e cuja escolha é efectuada atendendo geralmente a duas finalidades: permitir a observação das interacções na zona de interface membranar, próximo das cabeças polares, em consequência da ancoragem do grupo TMA nessa região; permitir a detecção de alterações

de fluidez de membrana por alinhamento do DPH paralelamente às caudas hidrocarbonadas dos fosfolípidos⁽¹⁴⁶⁾.

Uma outra vantagem da utilização destas sondas advém-lhes do facto de praticamente não apresentarem fluorescência em água, isto é, a intensidade de fluorescência emitida aumenta cerca de 10 000 vezes após inserção destas sondas nas membranas lipídicas, tornando desprezável uma possível fluorescência de fundo que possa existir. Concomitantemente, os seus coeficientes de partição lípido/água demonstraram-se bastante elevados, tendo-se obtido valores de $1,3 \times 10^6$ para o DPH e de $2,4 \times 10^5$ para o TMA-DPH⁽¹²⁷⁾.

Relativamente à localização destas sondas nas bicamadas lipídicas, vários estudos revelam que quer o DPH, quer os seus derivados, se encontram inseridos no interior das membranas a profundidades semelhantes⁽¹⁴⁷⁾. A localização dos derivados pode ser explicada pelo comprimento da cadeia insaturada do DPH e pela sua orientação paralelamente às caudas hidrofóbicas dos fosfolípidos membranares. Assim, a acomodação dos grupos carregados ocorre ao nível da superfície polar, enquanto que a restante fracção da molécula mantém a localização profunda do DPH. Assim, o TMA-DPH está localizado a uma profundidade inferior ao DPH de apenas 3 Å (11 Å vs 8 Å) sendo estes valores referentes às distâncias dos fluoróforos ao centro da bicamada membrana⁽¹⁴⁷⁾.

4.2.3 Ressonância Paramagnética Electrónica (RPE)

A espectroscopia de ressonância de *spin* electrónico é um método de investigação de substâncias paramagnéticas usando radiação electromagnética na gama das micro-ondas (GHz).

Na presença de um campo magnético externo H , os dois estados de *spin* electrónico, caracterizados por $m_s = \pm \frac{1}{2}$, deixam de ser degenerados, e ficam separados por:

$$\Delta E = g \beta H \quad (8.0)$$

onde $\beta = 9,274 \times 10^{-24} \text{ JT}^{-1}$ é uma constante (magnetão de Bohr) e $g = 2,0023$ para um electrão livre. Na presença de um campo electromagnético, podem ser induzidas transições entre estes dois níveis se a energia se a energia $h\nu$ da radiação for igual a ΔE (condição de ressonância). Na prática, ν é mantido constante (dentro da gama das micro-ondas), e é feito um varrimento de intensidades de campo magnético.

Os espectros usuais de RPE têm a forma característica representada na Figura I-28, diferindo apenas no número e amplitude dos picos obtidos. As bandas de RPE são divididas em múltiplas componentes devido à interacção com momentos magnéticos nucleares provenientes de núcleos de *spin* não nulo. Caso existam vários núcleos de *spin* não nulo, a sua acção conjunta sobre o espectro será a composição das acções individuais de cada núcleo. Para um radical nitróxido (exemplo da Figura I-28), o espectro tem três picos, devido ao núcleo adjacente de ^{14}N ($I = 1$, $m_I = 0, \pm 1$).

Tanto a posição da banda (isto é, o valor de g) como a separação das suas componentes (constante de acoplamento hiperfino) dependem da orientação da molécula relativamente ao campo aplicado, o que resulta na sensibilidade do espectro aos movimentos rotacionais (Figura I-28). Assim, a partir da forma do espectro podem obter-se informações como o tempo de correlação rotacional (t_c), ou o parâmetro de ordem (S)⁽⁴¹⁾. Este efeito pode ser aproveitado para o estudo de características e interacções do ambiente em que a espécie paramagnética se insere.

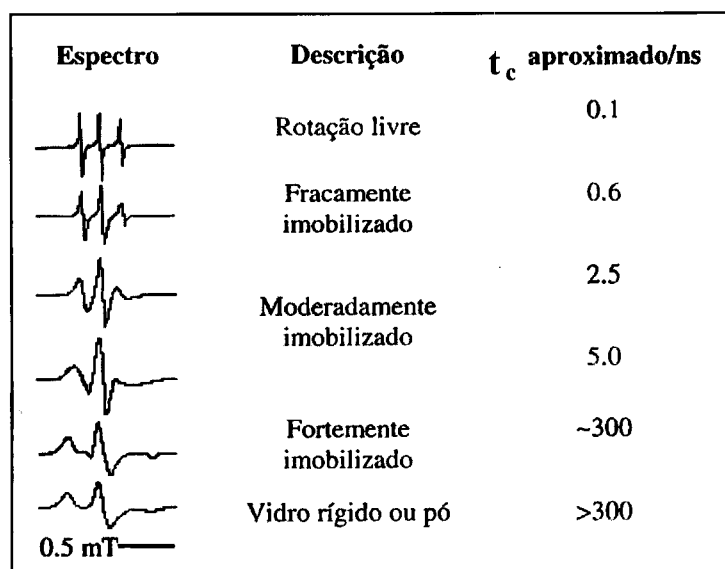


Figura I-28: Espectro de RPE de uma sonda nitróxido, em ambiente membranar, sujeita a variações de temperatura e, consequentemente, de viscosidade. Análise dos efeitos sobre o tempo de correlação rotacional (t_c). Adaptado da referência [41].

A fluidez membranar quando avaliada por RPE tem por base a determinação de dois parâmetros principais: o tempo de correlação rotacional (t_c) e o parâmetro de ordem (S). Salienta-se que nenhum destes métodos faz uma avaliação directa da fluidez membranar, pois nenhum destes parâmetros se relaciona de modo simples e directo com esta característica membranar, contudo constituem uma ferramenta útil na análise espectral comparativa com vista à detecção de factores indutores de alterações membranares⁽¹⁴⁸⁾. A

escolha de um ou outro destes parâmetros está directamente relacionada com a localização membranar da espécie paramagnética, ou seja, se esta se apresenta com uma localização ao nível do centro da bicamada lipídica, afastada da interface, zona onde é reconhecida uma maior fluidez membranar, os espectros de RPE que se originam apresentam-se com boa definição o que facilita a determinação dos tempos de correlação rotacional, de acordo com a expressão (8.1)⁽¹⁴⁸⁾:

$$\tau_c = 6,5 \times 10^{-10} W_0 \left[\left(\frac{h_0}{h_{-1}} \right)^{1/2} - 1 \right] \quad (8.1)$$

em que W_0 , h_0 e h_{-1} são parâmetros obtidos do espectro, sendo W_0 a largura de banda pico a pico da linha central do espectro e h_0 e h_{-1} as alturas, pico a pico, da banda central e da banda a menor campo magnético, respectivamente.

Paralelamente, a presença da espécie paramagnética em zona próxima da interface membranar, onde é conhecido um maior grau de compactação membranar, a mobilidade da sonda fica sujeita a fortes restrições, o que resulta em espectros mais distendidos e de limites mal definidos. Consequentemente, a extracção dos valores espectrais necessários ao cálculo do t_c torna-se difícil e susceptível de grandes imprecisões, nessa situação o parâmetro que habitualmente se determina é o parâmetro de ordem (S), de acordo com a seguinte expressão:

$$S = a \frac{T'_{\parallel} - T'_{\perp}}{T_{\parallel} - T_{\perp}} \quad (8.2)$$

onde $T_{\parallel}$ e $T_{\perp}$ são as constantes hiperfinas da espécie imobilizada e a um factor de correlação introduzido para minimizar possíveis efeitos de polaridade local⁽¹⁴⁸⁾. Contudo, na maioria dos espectros obtidos nestas condições $T'_{\perp}$ não é mensurável o que requer que se façam simulações do espectro para se tentar obter S , e portanto, na prática, assume-se que o aumento de $T'_{\parallel}$ é indicativo de um aumento de S .

Qualquer um dos referidos parâmetros (t_c ou S) é normalmente utilizado para efeitos comparativos e sempre sob o ponto de vista qualitativo pois é-lhes inerente um elevado grau de imprecisão o que inviabiliza uma determinação quantitativa rigorosa. Adicionalmente, um inconveniente intrínseco às técnicas que recorrem à incorporação de

sondas de *spin* é que a presença destas moléculas na membrana, apesar de normalmente derivarem de constituintes membranares, constitui sempre uma perturbação ao estado natural do sistema membranar pelo que a informação delas extraída contém sempre um certo grau de adulteração, dificuldade que pode ser obviada pelo recurso a estudos comparativos e pela utilização de sondas com diferente localização membranar ⁽¹⁴⁹⁾. Na realidade, o que é avaliado é a presença ou ausência de alterações espectrais em função do factor em estudo, dando-se pouca relevância ao resultado quantitativo que é obtido ⁽¹⁴⁸⁾.

4.2.3.1 Sondas utilizadas

Uma vez que os componentes naturais das biomembranas não possuem electrões desemparelhados, os estudos em ambiente membranar por RPE são efectuados recorrendo a moléculas derivadas com um grupo paramagnético, frequentemente derivado do radical nitróxido (NO[•]). A figura I-29 mostra a estrutura das duas sondas de *spin* utilizadas nos estudos efectuados:

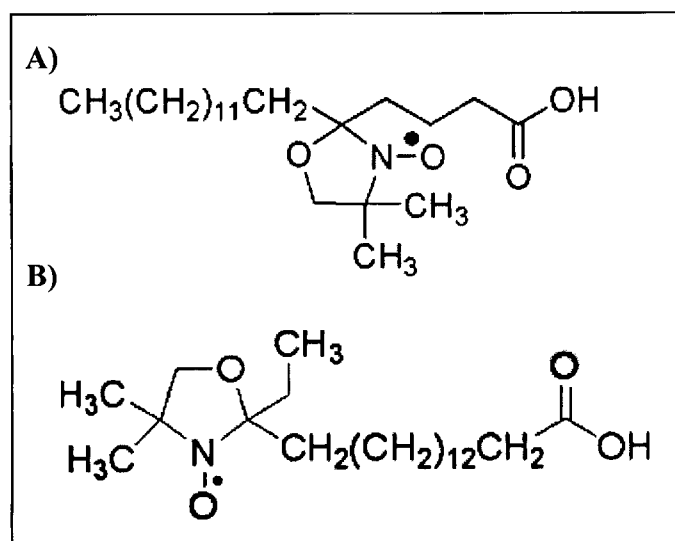


Figura I-29: Estruturas químicas das sondas de *spin* utilizadas. Sondas para RPE obtidas a partir do ácido esteárico marcado com grupos doxil (4,4-dimetil-3-oxazolidinil) nas posições 5 e 16: A) ácido 5-doxil-esteárico (5-DS) e B) ácido 16-doxil-esteárico (16-DS).

Estudos efectuados sobre a localização membranar destas sondas demonstram que quer os ácidos gordos marcados com grupos paramagnéticos quer os derivados esteróides tem uma orientação membranar idêntica aos lípidos membranares, e portanto a informação que fornecem relaciona-se com a localização dos grupos paramagnéticos ao longo do seu eixo molecular principal ⁽¹⁴⁹⁾. Assim, a utilização das sondas 5-DS e 16-DS permite investigar alterações membranares das duas principais zonas membranares, a zona dos grupos

polares, próxima à interface membranar (5-DS) e a zona hidrofóbica da extremidade das cadeias hidrocarbonadas (16-DS).

4.3 Interação Proteína - Ligando : Determinação de Constantes de Associação

As interações entre proteínas e ligandos constituem a base de um conjunto alargado de processos responsáveis pela comunicação e regulação das trocas celulares com o meio externo.

Se o ligando em causa se tratar de um fármaco, o conhecimento sobre a sua associação com as diferentes macromoléculas biológicas, em particular com as proteínas, é determinante para o estabelecimento dos seus parâmetros farmacológicos e toxicológicos. No caso concreto da interação da célula bacteriana com fármacos antibacterianos, a ligação às diferentes componentes proteicas da célula bacteriana pode definir desde a entrada do fármaco na célula até ao desenvolvimento da sua actividade farmacológica. Assim, a quantificação da sua afinidade por determinada componente proteica assume neste contexto particular importância.

A membrana externa das bactérias de Gram (-) constitui uma eficiente barreira para agentes externos tóxicos para a bactéria, facultando-se entrada às substâncias necessárias à sobrevivência da célula através de canais hidrofílicos designados de porinas, das quais a OmpF constitui exemplo. Contudo, paralelamente à sua função, as porinas constituem ainda uma importante via de permeação a numerosas classes de antibióticos, como os β -lactâmicos e as quinolonas, que com elas interactivam em diferentes graus de eficiência. O tipo de interação estabelecido e a maior ou menor afinidade com que as diferentes moléculas antibacterianas se associam com estas proteínas é muitas vezes determinante para o desenvolvimento da sua actividade antibacteriana revelando-se essencial o seu conhecimento não só para o desenvolvimento de novas moléculas activas, bem como para o esclarecimento de novas formas de resistência bacteriana.

A determinação de constantes de associação proteína – ligando representa uma forma eficaz de se avaliar a extensão da afinidade de um qualquer ligando por determinada proteína.

4.3.1 Considerações Gerais

A interação de duas espécies moleculares em solução pode desencadear a formação de um complexo molecular, aqui definido como o resultado da ligação ou associação, não covalente e estequiometricamente definida, entre substrato e seu ligando. A percepção da

formação de tal complexo molecular está normalmente associada à determinação de uma qualquer propriedade física ou química de uma das espécies moleculares em solução, neste caso designada de substrato, por aumento da concentração da segunda espécie, designada de ligando. De entre as propriedades do substrato que poderão ser avaliadas destaca-se a absorção de luz, o efeito sobre o fenómeno de ressonância magnética nuclear, a solubilidade, a condutância e efeitos sobre a sua reactividade química. É a alteração de uma destas propriedades em função da concentração de ligando que desencadeia o reconhecimento da eventual formação de um complexo⁽¹⁵⁰⁾.

As forças de ligação envolvidas na formação de um complexo molecular são vulgarmente designadas de forças intermoléculares ou forças atractivas, podendo ser do tipo: electrostático, de indução ou de dispersão. Ou seja, o tipo de interacção aqui salientado não envolve ligação covalente mas antes uma interacção rápida, desencadeada por forças atractivas resultantes da compatibilidade entre substrato e ligando.

As constantes de equilíbrio que regem a formação dos referidos complexos moleculares constituem, neste contexto, constantes de estabilidade estequiométricas do complexo, traduzindo o grau de afinidade/compatibilidade do par substrato/ligando, e sendo obtidas de acordo com:



sendo,

$$K_{mn} = \frac{[S_m L_n]}{[S]^m \cdot [L]^n} \quad (9.1)$$

As constantes assim definidas são também designadas de constantes de ligação ou de associação. A constante para o processo inverso é, por oposição, designada de constante de dissociação.

Da análise da expressão (9.1), depreende-se que a determinação da constante de associação requer o conhecimento prévio da estequiometria do processo. Tal informação pode ser obtida das mais variadas formas que podem ir desde a sugestiva observação de pontos isobésticos em espectros de absorção da mistura⁽¹⁵⁰⁾, da comparação das constantes obtidas por diferentes técnicas^(150, 151), ou pelo ajuste das expressões geradas aos resultados obtidos após se assumir determinado modelo⁽¹⁵⁰⁾. O estabelecimento de um modelo ou hipótese tem por base um conhecimento prévio do sistema em estudo o que proporciona uma orientação para o estabelecimento das condições experimentais.

4.3.2 Análise de Resultados

A determinação de uma constante de associação para a formação de um qualquer complexo molecular passa normalmente pela formulação de uma situação experimental em que se tem uma solução contendo o substrato (S) em presença do ligando (L), pretendendo-se quantificar uma propriedade (Y) que varia em função da concentração total de ligando. O sistema pode assim descrever-se de acordo com:

$$Y_i = f([L]_i, \eta_j) \quad (9.2)$$

em que Y_i representa o valor da propriedade avaliada (variável dependente) a uma concentração de ligando L_{ti} ; $[L]_i$ representa a concentração de ligando livre em solução relativamente a L_t e η_i e λ_k representam parâmetros do sistema. A forma da função e a natureza dos parâmetros depende da natureza do sistema em estudo e do modelo assumido para a estequiometria. Os referidos parâmetros incluem assim a (s) constante (s) de associação. A equação (9.2) constitui uma das formas de representar a isotérmica de ligação que define o sistema em estudo.

Relativamente à estequiometria assumida, é normalmente apropriado começar por testar os resultados com o modelo mais simples, formação de um complexo na proporção 1:1, só se avançando para modelos mais complexos no caso de este não ser compatível com os valores experimentais obtidos ^(150, 152). Assim, na sua forma mais simples, a isotérmica de ligação para a formação de um complexo de estequiometria 1:1 é dada por:

$$f_{11} = \frac{K_{11}[L]}{1 + K_{11}[L]} \quad (9.3)$$

A representação gráfica da isotérmica de ligação constitui uma ferramenta valiosa para uma interpretação qualitativa e, posteriormente, quantitativa do sistema. A função gráfica que faz a relação directa da propriedade avaliada (y) em função da concentração de ligando (x), é designada de curva de associação (Figura I-30).

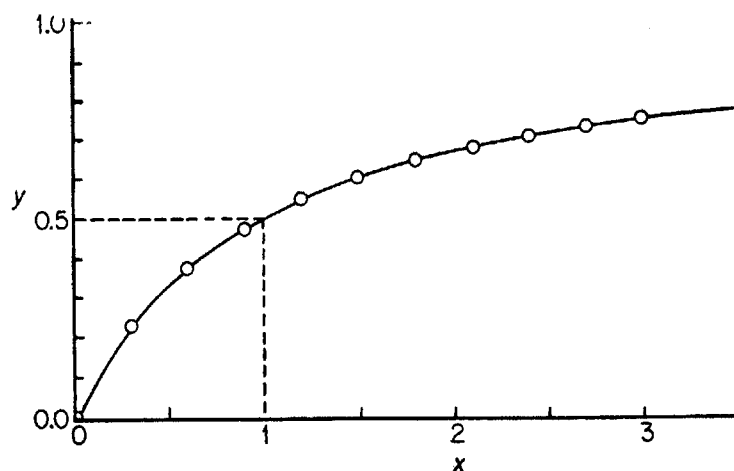


Figura I-30: Representação teórica, geral, de uma curva de associação. Adaptado da referência [150].

O intervalo de concentrações abrangido pela curva de associação deverá ser o mais alargado possível de forma a possibilitar uma análise bastante completa da interacção em avaliação. Contudo, na prática este objectivo é por vezes difícil de atingir em consequência de limitações experimentais que vão desde dificuldades ao nível da solubilidade de qualquer um dos intervenientes, até às mais diversas dificuldades analíticas.

Num sistema simples de associação substrato/ligando com a formação de um complexo 1:1, os resultados dos ajustes não lineares à isotérmica de ligação e aqueles obtidos por linearização da mesma devem mostrar-se igualmente bem sucedidos e originando valores numéricos semelhantes, de forma a comprovar-se a aplicabilidade do modelo ⁽¹⁵⁰⁾.

Existem três formas não logarítmicas de linearização de uma curva de associação. Partindo da equação (9.3), e considerando $f_{11} = y$ e $[L] = x$, é possível obter-se:

$$\frac{1}{y} = \frac{f}{d} \cdot \frac{1}{x} + \frac{e}{d} \quad (9.4)$$

$$\frac{x}{y} = \frac{e}{d} x + \frac{f}{g} \quad (9.5)$$

$$\frac{y}{x} = -\frac{e}{f} y + \frac{d}{f} \quad (9.6)$$

em que x e y representam respectivamente a variável independente e a variável dependente, e d , e e f representam constantes ou parâmetros. O traçado gráfico de $1/y$ em função de $1/x$ (9.4) resulta numa função linear que em estudos espectroscópicos é conhecida como

função gráfica de Benesi-Hildebrand⁽¹⁵³⁾ ou simplesmente gráfico dos recíprocos duplos (Figura I-31A). A representação gráfica de x/y em função de x é designada de gráfico dos recíprocos de y (Figura I-31B) e a representação de y/x em função de y é conhecida como o gráfico de Scatchard⁽¹⁵⁰⁾ muito frequente em estudos de associação envolvendo proteínas (Figura I-31C).

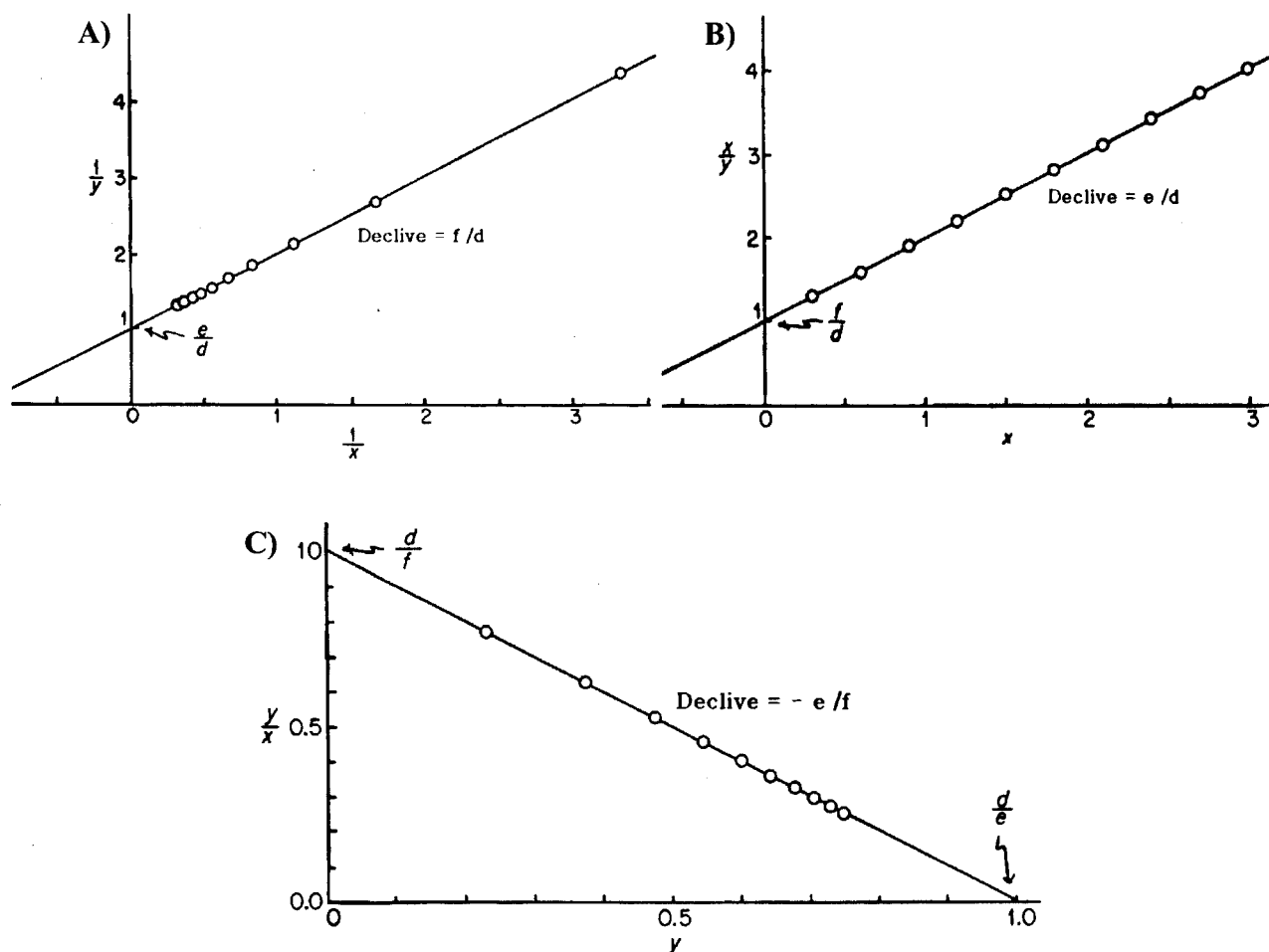


Figura I-31: Representação gráfica teórica das formas de linearização não logarítmica da curva de associação. A) Gráfico de Benesi-Hildebrand ou dos recíprocos duplos; B) Gráfico dos recíprocos de y ; C) Gráfico de Scatchard. Adaptado da referência [150].

A aplicabilidade das equações 9.4, 9.5 e 9.6 aos resultados experimentais permite testar a validade do modelo estequiométrico definido pela equação 9.3, isto é, se se obtiverem relações lineares com valores de parâmetros semelhantes aos obtidos por ajuste não linear confirma-se a aplicabilidade do modelo de formação de complexo na proporção 1:1. A validade desta condição é necessária para se aceitar o modelo estipulado, contudo por si só não é suficiente, pois se a avaliação experimental cobrir apenas uma pequena porção da curva de ligação, qualquer uma das formas de linearização irá descrever apenas uma

parcela da interacção desenvolvida, omitindo eventuais desvios de linearidade que constituiriam indicação da inaplicabilidade do modelo em teste⁽¹⁵⁰⁾.

Após confirmação do modelo proposto procede-se à determinação dos parâmetros que melhor caracterizam a interacção substrato/ligando, isto é, procede-se ao cálculo da constante de associação. Uma das vias possíveis consiste em resolver a isotérmica de associação para as diferentes concentrações de ligando testadas, ou então, proceder ao ajuste não linear das equações adoptadas segundo o modelo seleccionado aos dados experimentais obtidos.

Os métodos experimentais utilizados para a determinação da constante de associação abrangem as mais diversas áreas, tudo dependendo da propriedade que sofre variação por associação do substrato ao ligando. De entre estes, destaca-se a espectrofotometria de UV-Vis e de fluorescência. Qualquer uma destas metodologias tem como condição essencial à sua aplicabilidade a ocorrência de uma alteração espectral significativa como consequência da associação entre substrato e ligando.

4.3.2.1 Espectroscopia de UV-Vis

Para um sistema constituído por uma proteína e um fármaco com a formação de um único complexo [PF] a absorvância da solução é proporcional à concentração de soluto em solução, isto é:

$$A = \varepsilon_P [P] + \varepsilon_F [F] + \varepsilon_{PF} [PF] \quad (9.7)$$

onde [P], [F] e [PF] são, respectivamente, as concentrações molares de proteína, fármaco e complexo, e ε_P , ε_F e ε_{PF} , correspondem aos coeficientes de extinção molar.

A diferença entre a absorvância da solução contendo todos os intervenientes do sistema e aquela obtida para uma solução contendo apenas a proteína na mesma concentração total, P_t , pode relacionar-se com a constante de associação através da seguinte equação:

$$\Delta A = \frac{P_t \Delta \varepsilon_{PF} K_{PF} [F]}{1 + K_{PF} [F]} \quad (9.8)$$

em que K_{PF} representa a constante de formação de um complexo 1:1. A linearização desta equação origina a equação (9.9), normalmente designada de equação dos recíprocos duplos ou equação de Benesi-Hildebrand⁽¹⁵⁰⁾:

$$\frac{1}{\Delta A} = \frac{1}{P_t \Delta \epsilon K_{PF} [F]} + \frac{1}{P_t \Delta \epsilon_{PF}} \quad (9.9)$$

4.3.2.2 Espectroscopia de Fluorescência

A determinação de constantes de associação entre proteína e fármaco pode também efectuar-se com base na variação à emissão de fluorescência da proteína em presença do fármaco. A associação da proteína a um fármaco com formação de um complexo proteína – fármaco pode resultar num aumento, se o complexo formado é também fluorescente, ou diminuição da intensidade de fluorescência inicial. A situação em que a intensidade de fluorescência diminui é designada por extinção de fluorescência estática, e constitui o resultado da formação de um complexo proteína–fármaco não fluorescente. Nesta situação a dependência da intensidade de fluorescência relativamente à concentração de fármaco adicionada revela-se proporcional à constante de associação do complexo formado:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{PF} [F] \quad (9.10)$$

onde I_0 e I representam a intensidade de fluorescência da solução de proteína na ausência e em presença do fármaco, respectivamente.

Note-se que a dependência de I_0/I relativamente a $[F]$ resulta numa relação linear idêntica à que se observa numa situação de extinção de fluorescência dinâmica, excepto na designação da constante de extinção de fluorescência, aqui designada de constante de associação que, paralelamente, também se distingue na grandeza dos valores numéricos que assume, valores esses apenas possíveis numa situação de associação ⁽³⁹⁾.

As constantes de associação podem ainda determinar-se por ajuste não linear, ao comprimento de onda de máxima emissão, à equação:

$$\Delta I = \frac{\Delta I_{\max} K_{PF} [F]}{1 + K_{PF} [F]} \quad (9.11)$$

Como se tem vindo a referir, a extinção de fluorescência é frequentemente utilizada para se obter informação sobre possíveis associações moleculares em torno de uma qualquer molécula fluorescente ^(154, 155). Assim, a extinção da fluorescência de uma

proteína para além de confirmar a interacção com um qualquer ligando, permite ainda inferir sobre a localização dessa interacção na estrutura proteica, apontando para zonas na proximidade dos triptofanos da estrutura.

4.4 Determinação em bicamada lipídica planar (BLP): transposição membranar mediada por canais iónicos (OmpF)

Os canais iónicos da membrana externa bacteriana, dos quais OmpF constitui exemplo, funcionam como vias de permeação para numerosas substâncias hidrofílicas, desde nutrientes importantes à subsistência da bactéria, mas também para numerosas moléculas com acção antibacteriana que graças à sua afinidade/complementaridade estrutural com o interior destes canais proteicos deles se aproveitam para aceder ao interior bacteriano. Grande parte do conhecimento sobre as vias de permeação dos diferentes grupos antibacterianos é obtida, por via indirecta, em estudos microbiológicos, notando-se uma necessidade crescente de estudar detalhadamente a interacção estabelecida entre a molécula antibacteriana e a porina que faculta o acesso facilitado ao alvo de acção antibacteriana, para melhor se responder a novas formas de resistência bacteriana e à necessidade de se obterem novas moléculas activas com actividade potenciada, menores resistências e de espectros antibacterianos mais alargados.

As bicamadas lipídicas planares constituem os sistemas miméticos de membrana ideais ao estudo destas proteínas membranares, pois paralelamente à sua estrutura em bicamada lipídica, que reproduz as características estruturais das membranas biológicas e portanto permite uma reconstituição funcional destas proteínas, permitem ainda o desenvolvimento de sistemas experimentais ideais ao estudo da sua função de transporte.

Para o estudo da transposição membranar com recurso a um canal iónico, uma das metodologias mais adequadas tem por base as suas propriedades de condução de corrente iónica.

4.4.1 Metodologias de preparação de BLP e sua aplicação ao estudo de canais iónicos por técnicas de condutimetria

No método originalmente descrito ⁽¹⁵⁶⁾ para a formação de bicamada lipídica planar, esta estrutura é formada na abertura central de um separador amovível, de superfície hidrófoba, obrigado a submergir num meio aquoso à superfície do qual se formou, previamente, uma monocamada lipídica (Figura I-32A). À medida que o separador é

forçado a submergir no meio aquoso a monocamada lipídica superficial é forçada a aderir a cada uma das faces do separador, formando-se assim a bicamada lipídica ao nível da abertura central (Figura I-32B).

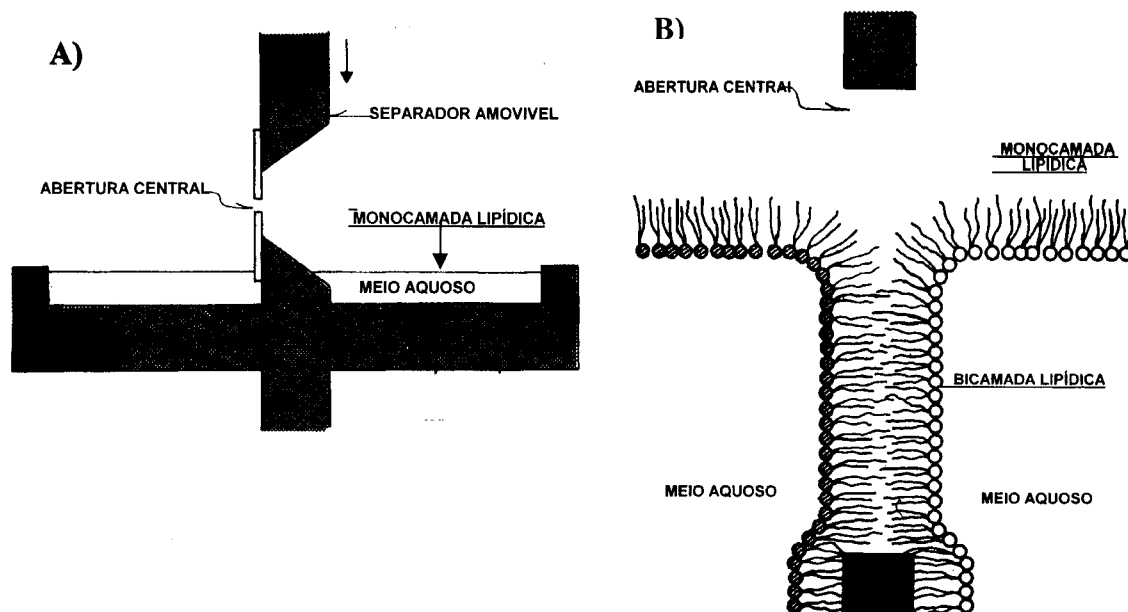


Figura I-32: A) Representação esquemática do dispositivo originalmente descrito por Montal e Müller⁽¹⁵⁶⁾ para a formação de BLP; B) Formação da bicamada lipídica planar na abertura central do separador. Adaptado da referencia [156].

Posteriormente, esta técnica foi alvo de algumas modificações⁽¹⁵⁶⁻¹⁵⁸⁾, tendo-se originado, entre outras, a técnica de formação de BLP por oposição de monocamadas lipídicas (metodologia adoptada nos estudos realizados). Nesta metodologia, o septo de Teflon[®] que faz a separação dos dois compartimentos aquosos é fixo e contém apenas um pequeno orifício central (50-80 μm de diâmetro), desencadeando-se a formação da bicamada lipídica através de um movimento de remoção e reposição do tampão aquoso de cada compartimento.

De entre as vantagens desta técnica relativamente às metodologias originais, destaca-se a maior semelhança estrutural das bicamadas formadas com as bicamadas das biomembranas, pois como resultado das menores dimensões do orifício central, relativamente à abertura dos dispositivos originais, formam-se bicamadas com maior compactação. Também a possibilidade de se formarem bicamadas lipídicas assimétricas pode constituir uma mais valia experimental. Paralelamente, a sua maior organização estrutural reflecte-se também numa maior rigidez, o que torna estas estruturas mais estáveis e permite a realização de um maior número de determinações experimentais com a

mesma bicamada lipídica. Porém, esta rigidez acresce algumas dificuldades ao nível da incorporação proteica, que se torna mais difícil em bicamadas obtidas por esta metodologia. Assim, as metodologias originais são ainda utilizadas quando se pretende uma inserção proteica massiva, utilizando-se as técnicas mais recentes sempre que se pretende um estudo individualizado do transporte de determinado substrato através do canal porínico em estudo, situação em que a inserção de uma única porina é factor essencial para uma avaliação mais refinada da translocação através do canal.

Ao contrário dos lipossomas, a utilização das bicamadas lipídicas planares faculta o acesso directo a cada um dos compartimentos aquosos separados pela bicamada, esta condição traz vantagens óbvias ao nível da manipulação da composição de cada uma destas soluções, mesmo no decurso das determinações experimentais. Daqui facilmente se depreende que este modelo membranar apresente as características experimentais ideais para estudos de transporte membranar através de canais iónicos.

A reconstituição de proteínas membranares nestas bicamadas lipídicas planares constitui um passo crucial para a utilização destes modelos membranares para o estudo da permeação membranar facilitada. Existe uma grande variedade de protocolos estabelecidos com este objectivo, sendo que um dos mais difundidos consiste em adicionar quantidades reduzidas de uma solução diluída de proteína em detergente (proteína incorporada em micelas de detergente) a um dos compartimentos aquosos do sistema, com consequente diluição do detergente para concentrações inferiores à sua CMC. O processo de inserção proteica na bicamada lipídica pode, assim, ser descrito da forma destacada na Figura I-33:

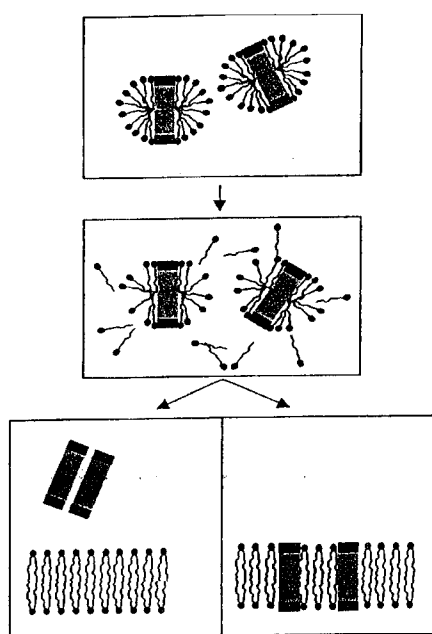


Figura I-33: Representação esquemática do procedimento de inserção proteica na bicamada lipídica planar.

A adição da solução micelar de proteína ao compartimento aquoso causa uma rápida diluição da concentração de detergente para valores abaixo da sua CMC. Consequentemente, as moléculas de detergente abandonam a estrutura proteica o que resulta ou numa situação de agregação proteica que impossibilita a inserção membranar, ou ocorre a inserção espontânea da proteína na bicamada lipídica. A prevalência de uma situação relativamente à outra é estritamente dependente das concentrações de proteína e detergente, e das condições de favorecimento da inserção membranar. De entre essas condições destaca-se a aplicação de elevadas diferenças de potencial transmembranar, o que parece favorecer a inserção membranar por um processo de destabilização estrutural temporária da membrana.

4.4.2 Condutância, selectividade iónica e propriedades electrofisiológicas das porinas: OmpF

Numerosas proteínas membranares funcionam como canais iónicos que regulam o fluxo de iões através das biomembranas, regulando o equilíbrio hidroelectrolítico dos ambientes celulares que separam. Muitos destes canais iónicos proteicos, naturalmente presentes nas biomembranas, alternam a sua conformação estrutural entre posições em que permitem ou não (canal aberto/ canal fechado) a difusão iónica, tudo dependendo das necessidades da célula ou organito que a biomembrana envolve. Esta alternância de estados conformacionais é grande parte das vezes governada por diferenças de potencial transmembranar impostas pelas condições dos meios intra e extra celular.

Paralelamente, estudos envolvendo a reconstituição membranar de porinas da membrana externa bacteriana, têm vindo a demonstrar igualmente uma actividade dependente de diferenças de potencial transmembranar, comportamento notado para porinas como a OmpF, OmpC e PhoE, isoladas da membrana externa de *E. coli*⁽¹⁵⁹⁻¹⁶²⁾.

A influência do potencial de membrana no estado conformacional que define as posições de canal aberto ou fechado destas porinas têm sido demonstradas pelas mais variadas técnicas experimentais⁽¹⁶³⁻¹⁶⁸⁾, tendo-se verificado que factores externos como o pH⁽¹⁶⁹⁻¹⁷¹⁾, a pressão⁽¹⁷²⁾, a presença de poliaminas⁽¹⁷³⁻¹⁷⁶⁾, ou de LPS na membrana de reconstituição⁽¹⁷⁷⁻¹⁸¹⁾ e mesmo o tipo de bicamada em que se insere a porina⁽¹⁸²⁾, influenciam o seu normal funcionamento. Suspeita-se que as alterações introduzidas à condutividade eléctrica das porinas por cada um destes factores, possa resultar quer do movimento da ansa L₃ em resposta às diferenças de potencial sentidas^(183, 184), quer de

alterações nas cargas eléctricas dos resíduos aminados da zona de constrição do canal ^(183, 185).

A porina OmpF constitui um dos canais iónicos mais abundantes da membrana externa bacteriana. Apresenta-se com uma estrutura quaternária em trímero, tendo-se demonstrado que cada um dos monómeros apresenta um comportamento independente relativamente aos outros no que respeita às suas características de transporte membranar, o que consequentemente se traduz pelo mesmo comportamento independente de cada monómero no que respeita à sua condutividade iónica ^(186, 187). Assim, cada monómero de OmpF constitui um canal com um diâmetro aproximado de $7 \times 10 \text{ \AA}$ e com selectividade catiónica ⁽¹⁸⁸⁾. A selectividade no que respeita o tamanho das partículas que permeiam o canal é dada por uma zona de constrição localizada sensivelmente a meio comprimento do canal (Capítulo I, item 2.3.1).

A referida susceptibilidade de modificação das características de condutividade eléctrica em função da diferença de potencial transmembranar, permite a comprovação de uma reconstituição membranar de OmpF na sua conformação nativa de trímero, pois a aplicação de diferenças de potencial de elevada amplitude desencadeia a interrupção faseada da corrente iónica através de OmpF (Figura I-34), fenómeno que, adicionalmente, confirma a actividade funcional independente de cada um dos monómeros que constitui OmpF.

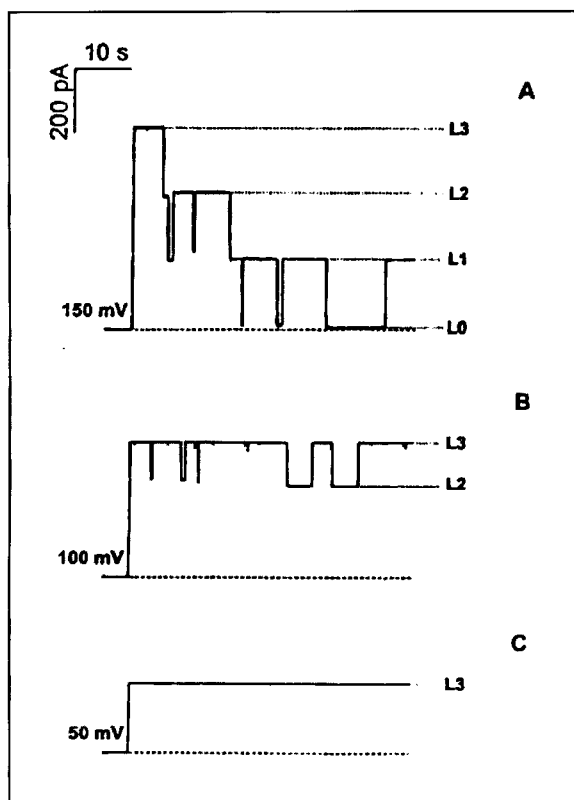


Figura I-34: Registo característico de corrente iónica através da porina OmpF, reconstituída em bicamada lipídica planar, e por aplicação de diferenças de potencial de 150 mV (A), 100 mV (B) e 50 mV (C). Em (A) é evidenciado o encerramento do canal em três passos aproximadamente iguais, revelando a organização estrutural e funcional de trímero. As linhas tracejadas L₃, L₂, L₁ e L₀ correspondem, respectivamente, às posições de canal totalmente aberto, um monómero fechado, dois monómeros fechados e trímero totalmente fechado. Bicamada lipídica formada a partir de uma solução lipídica a 1% de DPhPC. Solução electrolítica contendo KCl (1,0 M) em 5 mM de tampão HEPES (pH 7,0). Adaptado da referencia [187].

4.4.3 Difusão membranar através de OmpF avaliada por técnicas de condutimetria

Numerosas moléculas como as poliaminas, colicinas A e N, penicilinas, cefalosporinas e algumas quinolonas, recorrem a OmpF para permearem a membrana externa bacteriana. A eficiência com que se difundem através deste canal iónico está estritamente dependente das interacções que estabelecem com áreas estruturais específicas de OmpF, de tais interacções resultam flutuações ao fluxo iónico mediado pela porina, que se forem suficientemente fortes puderam ser reproduzidas experimentalmente por técnicas condutimétricas em bicamada lipídica planar.

Na ausência de qualquer interacção entre uma dada partícula e o canal por ela permeado, a duração da passagem ou o tempo característico de permeação do canal (t) é calculado de acordo com ^(189, 190):

$$\tau = \frac{L^2}{12D} \quad (10.0)$$

em que L representa o comprimento do canal (no caso de OmpF $\sim 5 \times 10^{-9}$ m) e D o coeficiente de difusão, que para uma partícula de tamanho na ordem dos nanómetros, seria na ordem de alguns nanosegundos. Contudo, se existirem interacções entre a referida partícula e o canal, este tempo de permeação sofre aumentos de várias ordens de grandeza, atingindo-se então valores na ordem dos microsegundos ⁽¹⁹¹⁾.

Partindo da reconstituição de um único trímero funcional de OmpF numa bicamada lipídica planar, demonstrou-se que a adição de ampicilina (antibiótico do grupo dos β -lactâmicos) provocava interrupções à pequena corrente iónica através da porina ⁽¹⁹²⁾. Tais interrupções demonstraram acontecer com duração característica das dezenas a centenas de microsegundos o que comparado com uma passagem através do canal por via puramente difusional, onde se esperariam períodos de tempo na ordem dos nanosegundos, dá indicação evidente da existência de interacção específica (Figura I-35). Foi com base nos mesmos pressupostos que se desenvolveram estudos semelhantes para as quinolonas.

A análise das flutuações à pequena corrente iónica através de OmpF, induzidas pela presença de determinado substrato (por exemplo um antibiótico) permite posteriores deduções sobre a sua interacção com o canal. Assim, se as interrupções à referida corrente iónica forem suficientemente longas de forma a serem mensuráveis e, adicionalmente,

ocorrerem de forma característica e dependente da concentração de substrato, torna-se possível relacioná-las com uma eventual ligação no lúmen do canal porínico.

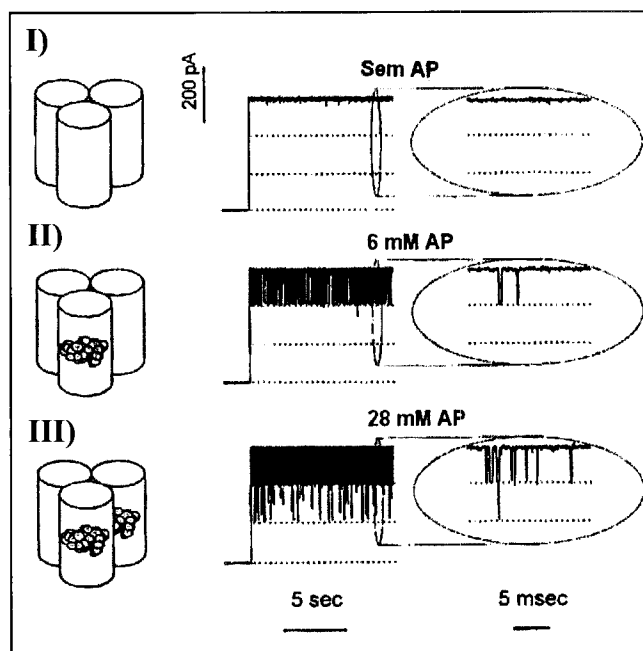


Figura I-35: Efeito modulador da corrente iônica através de OmpF, reconstituída em bicamada lipídica planar, por permeação do antibiótico Ampicilina (AP). Tampão electrolítico contendo 1 M de KCl (pH 6,0); diferença de potencial aplicada foi de -100 mV. I) Ausência de AP, verifica-se um registo da corrente iônica estável, livre de oscilações mesmo quando observado a maior resolução (registos gráficos à direita); II) Presença de 6 mM de AP, induz maiores oscilações de corrente, e a maior resolução evidenciam-se alguns bloqueios; III) A concentrações elevadas de AP, nota-se uma acentuada oscilação de corrente, e a maior resolução são evidentes numerosos eventos de bloqueio dos canais. Adaptado da referência [192].

Na ausência de interação entre a porina e substrato, a corrente iônica através dos canais apresenta-se com um traçado bastante estável, oscilando apenas muito ligeiramente em torno do seu valor médio. A presença de moléculas de substrato nos canais resulta num aumento de amplitude de oscilação das flutuações de corrente. Esta flutuação adicional de corrente iônica reflecte a associação/dissociação do ligando com o canal ⁽¹⁸⁶⁾. Assim, esta modulação da corrente iônica através da porina em presença do substrato, constitui prova de permeação do substrato através do canal ^(24, 193, 194).

Para maior conveniência de análise dos resultados, as oscilações de corrente em função do tempo (valores extraídos experimentalmente) são convertidas em amplitudes de frequência, recorrendo-se para isso a uma análise de densidade espectral ⁽¹⁹⁵⁾. Assim, as referidas oscilações de corrente iônica através do canal, resultam num traçado espectral ajustável a uma função Lorenteziana (Figura I-36) ^(158, 196, 197).

$$S(f) = \frac{S(0)}{1 + (f/f_c)^2} \quad (10.1)$$

O ajuste do espectro à função Lorenteziana ($S(f)$) permite a determinação da frequência angular (f_c), a qual se relaciona com o tempo característico de permeação (t) de acordo com:

$$\tau = (2\pi f_c)^{-1} = (k_{Ass}[C] + k_{Diss})^{-1} \quad (10.2)$$

Se a ligação do substrato (ex. antibiótico) num dos canais da porina bloquear a difusão iónica de forma dependente da concentração de substrato adicionada ($[C]$) tal relação poderá ser usada para se obterem as constantes de ligação/dissociação (k_{Ass} / k_{Dis}) do substrato à porina ^(24, 193, 194).

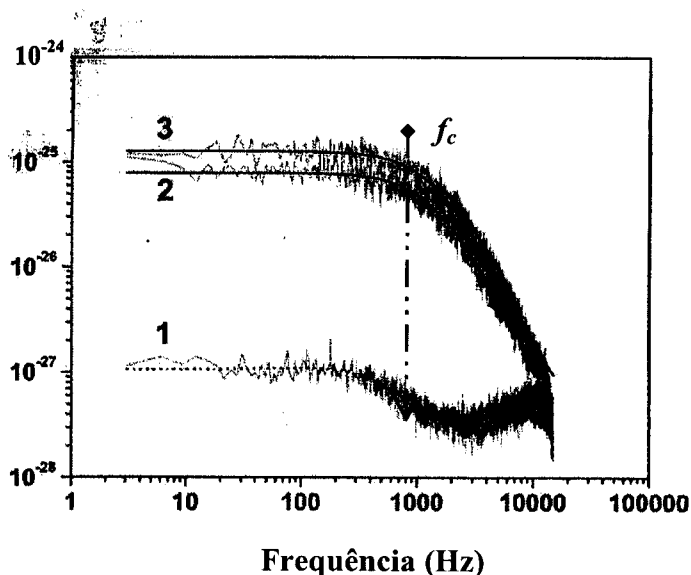


Figura I-36: Representação gráfica da densidade espectral resultante das oscilações de corrente através da porina OmpF, na ausência (1) e em presença de concentração crescente de antibiótico Ampicilina (2 e 3). Destaca-se a zona de inflexão e respectivo valor de frequência angular (f_c). Porina inserida em bicamada lipídica planar, mergulhada em solução tampão 1M de NaCl, e com a aplicação de uma diferença de potencial de -100 mV. Adaptado da referência [192].

Por último, resta salientar a elevada sensibilidade desta metodologia, que torna possível a detecção da passagem do substrato através do canal, ao nível molecular ⁽¹⁹⁸⁾, permitindo, adicionalmente, confirmação inequívoca da localização da interacção entre o canal e o substrato ao nível do lumem dos canais porínicos. Esta elevada sensibilidade justifica a

mais recente utilização deste tipo de metodologia ao nível da triagem de novas moléculas com eventual potencial antibacteriano, e, paralelamente, como sensores químicos de determinadas espécies químicas ^(199, 200). Contudo, a técnica tem também as suas limitações, principalmente no que concerne a estabilidade das bicamadas formadas e da componente proteica a reconstituir.

***CAPÍTULO II:* METODOLOGIA EXPERIMENTAL**

CAPÍTULO II: METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Ao longo deste capítulo irá proceder-se a uma descrição geral das condições experimentais, da instrumentação e dos reagentes utilizados na execução experimental deste trabalho. As condições experimentais específicas a cada técnica serão descritas, posteriormente, nas secções com elas relacionadas.

1. Reagentes e Soluções

O ácido nalidíxico (AN) foi adquirido à Sigma, a ciprofloxacina (CP) e a moxifloxacina (MX) foram uma oferta da Bayer e a grepafloxacina (GP) foi cedida pela Glaxo-Wellcom. Estes antibióticos foram armazenados à temperatura ambiente, protegidos da luz e utilizados sem qualquer purificação adicional.

Os lípidos usados foram o L- α -dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), o L- α -dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG) e o 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DPhPC) adquiridos à Avanti Pollar Lipids, armazenados a -18 °C e utilizados sem purificação adicional.

As sondas de fluorescência 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) e o 1-(4-trimetilamoniumfenil)-6-fenil-1,3,5-hexatrieno (TMA-DPH), e as sondas para EPR de ácido esteárico marcadas com grupos doxil (4,4-dimetil-3-oxazolidinil) nas posições 5 e 16 (ácido 5-doxil-esteárico e o ácido 16-doxil-esteárico), foram adquiridas à Sigma. Estas sondas foram dissolvidas em clorofórmio e armazenadas ao abrigo da luz e à temperatura de 0 °C.

O tampão utilizado na preparação de todas as soluções e suspensões, ácido N- (2-hidroxi-3-(3-sulfopropil)propil)piperazina-N-etanosulfónico (Hepes), foi obtido da Sigma.

As soluções padrão de diidrogenofosfato de potássio, utilizadas no doseamento dos lípidos, foram preparadas por diluição rigorosa de uma solução mais concentrada, obtida por dissolução, após pesagem rigorosa, do reagente de qualidade *pro analysi* obtido da

Merck. O reagente de Fiske & Subbarow, também utilizado no doseamento dos lípidos, foi sempre preparado extemporaneamente tendo sido adquirido à Sigma.

As soluções de iodeto de potássio e acrilamida prepararam-se, por pesagem rigorosa e dissolução em tampão Hepes, no dia de utilização e para uma concentração final de 5,0 M. A solução de iodeto de potássio foi sempre adicionada de tiosulfato de sódio (10 mM) de modo a prevenir a formação do ião I_3^- . O teor rigoroso de ião iodeto em cada solução preparada é obtida por titulação deste, numa mistura de tetracloreto de carbono e ácido clorídrico concentrado, com uma solução padrão de iodato de potássio ⁽²⁰¹⁾. O iodeto e o iodato de potássio foram obtidos da Merck, qualidade *pro analysi*.

As soluções dos fármacos que se utilizaram na maioria dos procedimentos experimentais foram preparadas por diluição rigorosa de soluções mais concentradas, preparadas em tampão Hepes 10 mM, pH 7,4, força iónica ajustada a 0,1 M com NaCl e mantidas ao abrigo da luz. As suspensões lipossómicas foram preparadas no mesmo tampão e utilizadas num período nunca superior a 3 dias após a sua preparação (conservadas a 4 °C e protegidas da luz).

Na extração de OmpF, preparação dos agregados micelares, e na reconstituição membranar utilizou-se o detergente n-octil-polioxietileno (oPOE) adquirido à Bachem AG, qualidade *pro analysi*.

As soluções padrão de BSA (albumina bovina) utilizadas no doseamento da proteína foram sempre preparadas, imediatamente antes de cada doseamento, em tampão Hepes (10 mM, pH 7,4 e força iónica ajustada a 0,1 M de NaCl), por diluição de uma solução padrão (1,0 mg/ml) adquirida à Sigma. As soluções de ácido bicinconínico e de sulfato de cobre (II) pentahidratado, usadas no mesmo doseamento, são parte integrante de um Kit da Sigma (BCA-1), para doseamento de proteínas.

A acrilamida, a bisacrilamida, o dodecilsulfato de sódio (SDS), o tampão Tris (2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol), a N, N, N', N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED), o persulfato de amónia (APS), a glicina, o glicerol, o azul de bromofenol e o azul de Coomassie, utilizados na electroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), adquiriram-se à Sigma, sob a designação de reagente para electroforese. Os padrões proteicos de peso molecular (27,000-180,000) adquiriram-se à Sigma como parte do Kit MW-SDS-BLUE. O metanol usado foi de qualidade *pro analysi* da Merck, e o ácido acético glacial qualidade *pro analysi* da Riedel-de-Haën.

O hexadecano e o n-hexano, utilizados nas experiências de condutância com OmpF, foram obtidos da Fluka, qualidade *pro analysi*.

A água, utilizada para a preparação do tampão e de alguns reagentes usados nos diversos ensaios realizados, foi previamente sujeita a dupla desionização, apresentando uma condutividade inferior a $0,1 \mu\text{Scm}^{-1}$.

2. Instrumentação Utilizada

As determinações espectrofotométricas de ultravioleta/visível foram efectuadas num espectrofotómetro UNICAM UV-300, equipado com acessório de controlo de temperatura por circulação de água termostaticada que permitiu a realização dos ensaios a $37,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Em todos os ensaios utilizou-se uma largura de fenda de 1mm e cubas de quartzo com um percurso óptico de 1 cm.

Os estudos de fluorescência efectuaram-se num espectrofluorímetro da Varian, modelo Cary Eclipse, associado a um dispositivo de controlo de temperatura ("peltier single cell holder") permitindo um rigoroso controlo de temperatura (precisão de $0,05^\circ\text{C}$) num intervalo de 0 a 100°C .

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

Para a preparação de lipossomas unilamelares utilizou-se um extrusor Lipex Biomembranes de 10 ml, e filtros de polycarbonato Nucleopore-Corning.

A granulometria dos lipossomas e proteolipossomas foi efectuada num Zeta Sizer 5000 (Malvern), equipado com um laser hélio-néon emitindo a 633 nm, com uma potência de 5 mW. O tamanho das micelas mistas, de oPOE/OmpF/DMPC e oPOE/OmpF/DMPG, foi determinado num Zeta Sizer Nano ZS (Malvern).

As determinações de RPE foram efectuadas num espectrómetro de banda X (9 GHz) da Bruker, modelo ESP 300E, equipado com unidade de controlo de temperatura (Bruker B-VT 2000), tendo-se efectuado todas as determinações à temperatura constante de 37°C .

A concentração de proteína e redução da quantidade de detergente das soluções de OmpF foi efectuada por ultra-filtração numa centrífuga Kubota 6900 com recurso a tubos Centricon® 10 000 da Amicon.

No procedimento para extracção de OmpF o rebentamento das células bacterianas efectuou-se numa prensa de French da Avestin Inc. Na extracção e purificação de OmpF,

as ultracentrifugações necessárias realizaram-se numa ultracentrifuga Beckman coulter CO-LE004 (rotor JA 25,50).

A separação das fracções de proteína inserida e não inserida, após os procedimentos de reconstituição, efectuou-se por ultracentrifugação numa ultracentrifuga Sorval Ultra Pró 80 (rotor T-1270, $r_{\max}$ de 8,20 cm).

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

3. Preparação de Lipossomas

Na preparação de lipossomas o processo utilizado teve por base a metodologia originalmente descrita por Bangham ^(44, 45).

Para a preparação das vesículas lipossómicas procedeu-se à evaporação à secura, sob corrente de argon (em balão de fundo redondo, 50 ml) de uma solução de lípido em solvente orgânico, clorofórmio para o DMPC e mistura clorofórmio/metanol 3:1 para o DMPG. De seguida, para total eliminação dos vestígios de solvente orgânico, submeteu-se o filme lipídico a vácuo por um período nunca inferior a 3h.

Após este período, efectuou-se a ressuspensão do filme lipídico por adição de uma solução aquosa de tampão Hepes (10 mM; pH 7,4; 0,1 M NaCl) tendo-se obtido, após agitação em vórtice a uma temperatura superior à de transição de fase (37 °C), uma dispersão de vesículas multilamelares (MLV). Estas MLVs foram, de seguida, sujeitas a cinco ciclos de congelação – descongelação, usando-se para tal azoto líquido (- 196 °C) e um banho de água termostaticada a 37 °C. Depois da estabilização da suspensão lipossómica a 37°C e ao abrigo da luz durante 30 minutos, procedeu-se a 10 passagens através do extrusor. A extrusão foi sempre efectuada a uma temperatura de 37 °C, superior à de transição de fase do lípido, e a uma pressão de 250 bar, em corrente de argon, fazendo-se passar a suspensão lipossómica através de membranas de policarbonato de poros com 100 nm de diâmetro.

No final do procedimento obteve-se uma suspensão de aspecto translúcido, constituída por lipossomas unilamelares com um diâmetro médio de 100 nm.

4. Extracção e Purificação de OmpF

A estirpe de *E. coli* BL21 (DE3) é mutante em relação à expressão das porinas da membrana externa, não expressando nenhuma dessas proteínas. Por transformação com o plasmídeo pGOmpF a estirpe mutante BL21 (DE3) omp8 passa a expressar apenas a porina OmpF e apresenta resistência à ampicilina, o que permite isolar a estirpe transformada, com a qual se obtém uma maior quantidade de OmpF livre de contaminação de outras porinas da membrana externa⁽²⁰²⁾.

A proteína que se utilizou neste trabalho, OmpF, foi extraída seguindo os procedimentos de extracção e purificação de OmpF que derivam de metodologias inicialmente descritas por Gravito⁽²⁰³⁾.

Após pré-cultura da estirpe bacteriana acima referida em meio de cultura selectivo (meio Luria-Bertani, LB, contendo 40 µg/ml de ampicilina, 37 °C, 12 horas), procedeu-se à inoculação em meio LB (diluição 1:20) e posterior incubação a 37 °C, com agitação. Durante este período de crescimento celular, monitorizou-se a densidade óptica a 578 nm e quando se atingiram valores entre 0,75 e 1,1 (fase de crescimento bacteriano exponencial), procedeu-se à indução da expressão do DNA plasmídico por adição de isopropiltiogalactoseamina (IPTG) numa concentração final de 0,4 mM. Seguiu-se novo período de incubação, com a duração mínima de 6 horas, a 37 °C e com agitação, depois do qual se recolheram as células bacterianas por centrifugação (3000 g, 25 °C, 20 minutos).

A extracção de OmpF a partir de 40 g de *pellet* celular bacteriano, iniciou-se com a ressuspensão deste em 400 ml de tampão Tris (20 mM, pH 8,0) contendo 2 % (m/v) SDS, e posterior adição de 50 µg/ml de DNase I. A homogeneização da suspensão e rebentamento celular efectuou-se por passagens sucessivas da suspensão por uma prensa de French (2000 bar), seguidas de uma hora de incubação a 60 °C sob agitação. O conteúdo celular bacteriano hidrossolúvel foi separado das restantes fracções celulares por centrifugação (20000 g, 25 °C, 45 minutos). O *pellet* foi então ressuspenso em 200 ml de tampão fosfato (20 mM, pH 7,3) contendo 0.125% (m/v) oPOE. Este tampão permite a dissolução da maioria das proteínas membranares, assim, após homogeneização por passagem na prensa de French e incubação sob agitação a 37 °C durante 45 minutos, procedeu-se à separação desta fracção proteica por ultracentrifugação a 180000 g durante 40 minutos. O *pellet* obtido foi ressuspenso em 200 ml de tampão fosfato (20 mM, pH 7,3) contendo 3% (m/v) de oPOE, seguindo-se homogeneização por passagem pela prensa de French e incubação

sob agitação, a 37 °C e durante 45 minutos. Uma última ultracentrifugação (180000 g, 40 minutos) permitiu obter OmpF em tampão fosfato (20 mM, pH 7,3) com 3% (m/v) oPOE.

4.1. Avaliação do Estado de Pureza e Estado Conformacional de OmpF: SDS-PAGE

O grau de pureza das soluções de OmpF, bem como a determinação do estado conformacional em que se apresenta a proteína, foi avaliado por electroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) contendo dodecilsulfato de sódio (SDS). A electroforese foi realizada de acordo com o procedimento inicialmente descrito por Laemmli ⁽²⁰⁴⁾, à temperatura ambiente, com corrente constante de 30 mA, num mini-dispositivo para electroforese da Hoefer[®] (10 × 8 cm). A percentagem de acrilamida presente no gel de concentração e no gel de separação é de 4 e 12%, respectivamente. Após electroforese os géis foram corados pelo azul de Coomassie (Coomassie Brillante Blue R250 da Sigma).

5. Preparação de Micelas Mistas de OmpF: oPOE/DMPC ou DMPG

Para se concentrar a solução mãe de proteína e reduzir a quantidade de detergente presente, submeteu-se uma quantidade adequada desta solução (tampão fosfato, 20 mM, pH 7,3, 3% (m/v) oPOE), em tubo Centricon[®] (2,0 ml por tubo), a duas centrifugações (4900 g, 4 °C, 40 minutos) em que, a cada centrifugação, se reduz a quantidade de tampão da solução proteica a metade, substituindo-se por tampão Hepes (10 mM, pH 7,4, 0,1 M NaCl) em igual quantidade na primeira centrifugação e metade da quantidade eliminada na segunda centrifugação.

O método de preparação de micelas mistas de oPOE/OmpF/fosfolípido (DMPC ou DMPG) consiste na preparação de filme lipídico, como já se descreveu para a preparação dos lipossomas. De seguida, a hidratação do filme lipídico é efectuada com uma solução em tampão Hepes (10 mM, pH 7,4, 0,1 M NaCl) contendo ~ 1 % oPOE e OmpF em quantidade apropriada para uma proporção final lípido/proteína (mol/mol) de aproximadamente 1000. A quantidade de detergente presente na solução de hidratação do filme lipídico obedece a dois critérios: ser superior à concentração micelar crítica (CMC) do detergente, neste caso 0,23 % ⁽²⁰⁵⁾, e suficiente para uma completa dissolução do filme lipídico; originar uma proporção lípido/detergente (m/m) de 0,20. A completa remoção do filme lipídico das paredes do balão foi conseguida com recurso a agitação em vórtice com

velocidade moderada por forma a evitar formação excessiva de espuma. Por último, a preparação foi deixada em repouso, protegida da luz, 15 minutos à temperatura ambiente e 1 hora no gelo, tendo sido utilizada num prazo nunca superior a 72 horas.

6. Preparação de Proteolipossomas

Para a preparação de proteolipossomas de OmpF, foram testadas duas metodologias de reconstituição proteica mediada por detergente:

1) Reconstituição por diluição de mistura micelar (co-micelização da proteína em mistura de lípido - detergente);

2) Reconstituição por incorporação em lipossomas pré-preparados (diluição de mistura detergente-proteína em suspensão lipossómica);

A reconstituição por diluição de mistura micelar tem por base a formação de micelas mistas de fosfolípido, detergente e proteína, com posterior formação de proteolipossomas por diluição do detergente. A metodologia de incorporação da proteína em lipossomas pré-preparados baseia o procedimento de inserção proteica na remoção do detergente de solubilização da proteína em presença de lipossomas previamente preparados.

6.1. Estudos preliminares: efeito do oPOE sobre LUV de DMPC

O acompanhamento das alterações introduzidas nos LUVs de DMPC pela presença de quantidades crescentes de oPOE foi efectuado por determinações do tamanho das estruturas, por espectroscopia de correlação fotónica e por avaliação da dispersão de Rayleigh por espectrofluorimetria ao comprimento de onda de excitação e de emissão de 450 nm (37 °C, abertura de fendas de excitação e emissão de 5,0 nm). A preparação da suspensão lipossómica utilizada efectuou-se de acordo com a metodologia anteriormente descrita e desta suspensão foram preparadas sete amostras e um branco. As amostras obtiveram-se por adição de igual volume de suspensão lipossómica (concentração de final de DMPC de 1,5 mM) e volumes crescentes de solução a 4 % (m/v) de oPOE (concentrações a variar entre ~0,06 e ~1,1 % (m/v) em oPOE). O branco continha apenas suspensão lipossómica de DMPC (1,5 mM) em tampão Hepes.

6.2. Reconstituição por Diluição de Mistura Micelar

A preparação de proteolipossomas por esta metodologia constitui uma adaptação dos protocolos de reconstituição descritos por O'Keeffe⁽²⁰⁶⁾.

A preparação do filme lipídico foi efectuada do mesmo modo descrito na preparação de lipossomas, tendo-se partido de uma quantidade de DMPC de aproximadamente 2,5 μmol . Após a fase de secagem do filme lipídico, este é ressuspenso em 200 μl de tampão Hepes (10 mM; pH 7,4; 0,1 M NaCl) contendo 0,8 % de oPOE e, aproximadamente, 0,15 mg (1,35 nmol) de OmpF. A mistura foi, posteriormente, submetida a aquecimento em banho de água (37 °C), alternadamente com agitação em vórtice a velocidade moderada. Seguiu-se um período de incubação da mistura, ao abrigo da luz, 15 minutos à temperatura ambiente e 1 hora no gelo. Seguidamente, diminuiu-se a concentração do oPOE a valores abaixo da sua CMC (0,23 %) ⁽²⁰⁵⁾, por diluição da mistura em 3,0 ml de tampão Hepes (10 mM; pH 7,4; 0,1 M NaCl). Paralelamente, à preparação dos proteolipossomas foi também preparada uma referência que se submeteu a todas as fases do procedimento descrito com a diferença de se ter hidratado o respectivo filme lipídico com tampão Hepes contendo 0,8 % oPOE mas sem proteína.

6.3. Reconstituição por Incorporação em Lipossomas pré-preparados

A preparação de proteolipossomas a partir de uma suspensão de vesículas lipossómicas previamente preparadas teve por base procedimentos descritos na literatura^(94, 207-209) tendo sido adaptada de acordo com o procedimento experimental que a seguir se descreve.

O processo de redução da quantidade de detergente na solução mãe de proteína, já descrito no item da preparação das micelas mistas, difere apenas no número de centrifugações, tendo-se procedido a um total de quatro centrifugações de forma a obter-se uma concentração final de oPOE de ~0,4 % (m/v). Seguidamente, procedeu-se à preparação da suspensão lipossómica, de acordo com a metodologia já descrita no item 3, e para uma concentração final de lípido de ~2,0 mM. Posteriormente, efectuou-se a mistura da suspensão lipossómica (~2,6 ml) com ~1,0 ml de solução de proteína (~0,45 mg/ml, em tampão Hepes com ~0,4 % oPOE), seguida de correcta homogeneização da mistura por agitação em vórtice a baixa velocidade. A proporção molar lípido/proteína utilizada foi aproximadamente de 1000. De seguida, procedeu-se à incubação da mistura, ao abrigo da luz, por um período de 15 minutos à temperatura ambiente, seguido de 1 hora no gelo. Terminada esta incubação, promoveu-se a adsorção do detergente à superfície dos Bio-Beads[®] SM2 (Bio-Rad), adicionados à mistura numa concentração de 0,2 g/ml, e incubou-

se à temperatura ambiente, sob agitação durante 3 horas. Após este período, procedeu-se à substituição, por decantação, da primeira fracção de Bio-Beads por uma segunda de iguais proporções, e iniciou-se um segundo período de 3 horas de incubação nas mesmas condições. Finalmente, decantou-se a mistura para a separar dos Bio-Beads e procedeu-se à uniformização do tamanho das estruturas obtidas por extrusão, nas mesmas condições utilizadas na preparação dos lipossomas, mas iniciando o processo com filtro de porosidade 200 nm e só depois de cinco passagens por este filtro se procedeu às dez passagens pelo filtro de porosidade 100 nm.

Para os estudos de fluorescência, os proteolipossomas foram ainda sujeitos a uma última ultracentrifugação (80000 g, 4 °C, 150 min) de forma a separar-se a fracção proteica inserida da não inserida. Por doseamento da fracção proteica não inserida que permaneceu no sobrenadante obteve-se o valor da percentagem de inserção.

O procedimento de preparação de proteolipossomas foi acompanhado desde o início pela preparação de uma amostra de referência, submetida a todas as fases acima descritas, adicionada de tampão Hepes com ~0,4 % oPOE mas sem qualquer vestígio de proteína.

7. Granulometria dos Lipossomas e Proteolipossomas

Na determinação da granulometria das vesículas lipossómicas e proteolipossomas recorreu-se à espectroscopia de correlação fotónica num Zeta Sizer 5000. Todas as determinações foram realizadas à temperatura constante de 25 °C ($\pm 0,1$ °C), numa célula constituída por tubo cilíndrico submerso em banho de água termostatzado.

8. Doseamento dos Lípidos

Para se determinar a verdadeira concentração fosfolipídica das suspensões lipossómicas utilizadas em cada ensaio, recorreu-se ao método de Bartlett modificado, que permite quantificar o conteúdo em fosfato de cada amostra e portanto, de forma indirecta, dá a conhecer a concentração fosfolipídica da amostra ⁽⁴³⁾.

O procedimento analítico consistiu na adição de 0,4 ml de ácido perclórico a 70 % a 0,5 ml de cada amostra e solução padrão de fosfato de potássio (em tubo de vidro), seguiu-se o aquecimento, em banho de areia, a uma temperatura compreendida entre 180-200 °C

durante 45 min. Após arrefecimento dos tubos à temperatura ambiente, adicionou-se 4,6 ml de molibdato de amónio e de seguida 0,2 ml de reagente de Fiske & Subbarrow, e procedeu-se a incubação em banho de água a 100 °C durante 7 min. Por fim, e após arrefecimento à temperatura ambiente, procedeu-se à leitura da respectiva absorvância a 830 nm.

9. Doseamento da Proteína

A determinação da concentração proteica foi efectuada pelo método do ácido bicinconínico (doseamento pelo BCA) ^(210, 211).

O kit de doseamento de proteínas pelo BCA é constituído por dois reagentes aleatoriamente designados de reagente A e B e por solução padrão de BSA (1,0 mg/ml em solução aquosa contendo 0,15 M de NaCl e 0,05 % de ázida sódica como conservante). O reagente A consiste numa solução contendo ácido bicinconínico, carbonato de sódio, hidrogenocarbonato de sódio e tartarato de sódio em hidróxido de sódio 0,1 N (pH final de 11,25). O reagente B consiste numa solução a 4 % de sulfato de cobre (II) pentahidratado.

A preparação do reagente de trabalho efectuou-se por adição de 50 partes de reagente A para 3 partes de reagente B. Seguidamente, a cada um dos tubos contendo 0,1 ml de amostra, ou padrão de BSA ou simplesmente tampão Hepes (branco), adicionou-se 2,0 ml de reagente de trabalho, e procedeu-se a incubação a 37 °C, 30 min. Após arrefecimento dos tubos à temperatura ambiente, seguiu-se a leitura da absorvância de cada uma das soluções a 562 nm. A concentração de proteína presente nas amostras foi obtida com recurso à recta de calibração construída a partir dos padrões de BSA (100- 600 µg/ml), preparados extemporaneamente para cada doseamento, por diluição da solução mãe de BSA.

10. Coeficientes de Partição

A determinação dos coeficientes de partição foi efectuada com recurso às técnicas de espectrofluorimetria e de espectrofotometria derivativa de UV-Vis ^(212, 213).

A metodologia desenvolvida foi aplicada à determinação dos K_p da moxifloxacina em vesículas lipossómicas unilamelares de DMPC e de DMPG, preparadas em tampão Hepes e posteriormente incubadas em presença deste fármaco.

10.1 Determinação dos Coeficientes de Partição por Espectrofotometria Derivativa de UV-Vis

Prepararam-se dois grupos de 8 a 10 microtubos de 1,5 ml, um desses grupos constituiu as amostras e o outro as suspensões de referência. As amostras foram obtidas por adição de um determinado volume de solução de fármaco (constante para cada ensaio) a volumes crescentes de suspensão lipossômica, perfazendo-se o volume final de 1,5 ml com Hepes. O grupo das referências recebeu igual tratamento mas não foi adicionado de fármaco. As concentrações de fármaco utilizadas nos vários ensaios foram escolhidas após determinação do intervalo de concentrações que verificava a lei de Lambert-Beer para a moxifloxacina em solução aquosa de tampão Hepes, tendo-se utilizado valores compreendidos entre 2 e 40 μM .

Por último, procedeu-se a agitação de cada microtubo em vórtice durante 1 min seguida de incubação a 37 °C, protegidos da luz, durante 30 min.

A aquisição dos espectros de absorção efectuou-se a 37 °C, com uma velocidade de 120 nm/min., em células de quartzo de 1 cm de percurso óptico e com fenda de 1 mm. Quer os espectros das amostras, quer os das referências foram traçados contra uma solução de tampão Hepes, tendo-se efectuado a correcção dos espectros das amostras por subtracção dos espectros das referências com a mesma quantidade de lípido.

Os espectros de primeira e segundas derivadas foram calculados partindo dos espectros de absorção das amostras, após correcção, usando o algoritmo de Savitzky-Golay⁽²¹⁴⁾ tendo-se utilizado uma convolução polinomial de sexta ordem com 10 pontos para cada um dos lados do ponto médio (sub rotinas do Microcal Origin 6.1).

10.2 Determinação dos Coeficientes de Partição por Espectrofluorimetria

Os valores de K_p obtidos por espectrofotometria derivativa de UV-Vis foram confirmados recorrendo à espectrofluorimetria. O procedimento experimental de preparação das amostras e referências foi o mesmo descrito no item anterior, tendo-se utilizado concentrações do intervalo que verificava a lei de Lambert-Beer para a moxifloxacina em solução aquosa de tampão Hepes (1 a 18 μM). Os espectros de emissão de fluorescência foram traçados a 37 °C, com abertura de fendas de excitação e emissão de 5,0 nm, velocidade de varrimento de 240 nm/min e utilizando células de quartzo de 10 mm $\times$ 10 mm. O intervalo de comprimentos de onda de emissão utilizado foi de 350-550 nm, com comprimento de onda de excitação de 288 nm. Em todos os ensaios efectuados a

absorvância das amostras e referencias, ao λ_{ex} , foi sempre inferior a 0,1 de forma a evitar efeito de filtro interno.

11. Estudos de Fluidiez e Localização Membranar

11.1 Extinção da fluorescência da moxifloxacina pelo ião iodeto

Para a realização destes estudos preparam-se três conjuntos de oito a dez microtubos (1,5 ml) sendo dois dos conjuntos destinados às amostras e o restante às referências. Cada um dos conjuntos das amostras foi preparado por adição de uma dada quantidade, constante em cada conjunto, de suspensão lipossômica de DMPC ou DMPG (500 ou 750 μ M), seguida por um volume constante, em todos os microtubos, de solução de moxifloxacina (3,4 μ M) e por quantidades crescentes de solução de KI (0,005 a 0,2 M). As referências foram preparadas do mesmo modo que as amostras mas sem adição de suspensão lipossômica. De seguida, amostras e referências foram sujeitas a um minuto de agitação em vórtice, e depois incubadas a 37 °C, durante 30 minutos. Os espectros de emissão de fluorescência foram traçados à temperatura de 37 °C, com velocidade de varrimento de 240 nm/min, abertura de fendas de excitação e emissão de 5,0 nm e ao comprimentos de onda de excitação de 288 nm no intervalo de comprimentos de onda de emissão de 350 e 550 nm.

11.2 Estudos de Anisotropia de Fluorescência

Os estudos de anisotropia de fluorescência foram efectuados recorrendo à incorporação nas bicamadas fosfolipídicas, dos lipossomas ou dos proteolipossomas, das sondas de anisotropia de fluorescência: o DPH e o TMA-DPH. A incorporação das sondas efectuou-se aquando da preparação dos filmes lipídicos por adição de adequado volume de solução clorofórmica de sonda à solução de lípido em clorofórmio, ou clorofórmio /metanol consoante se trate, respectivamente, de DMPC ou DMPG. A razão lípido/sonda utilizada em todos os ensaios foi de aproximadamente 300:1. As fases seguintes de preparação dos lipossomas ou proteolipossomas, seguiram o procedimento habitual e já descrito em secções anteriores.

O estudo da variação da anisotropia de fluorescência em função da variação de temperatura foi realizado no intervalo de 10-40 °C ($\pm$ 0,05 °C). As leituras de anisotropia de fluorescência efectuaram-se com abertura de fendas de emissão e excitação de 5,0 nm,

sob agitação e ao comprimento de onda de excitação de 336 nm e de emissão de 450 nm, para o DPH. Relativamente ao TMA-DPH, a excitação foi a 355 nm e observou-se a emissão a 427 nm. Quer em presença da moxifloxacina, quer no caso dos proteolipossomas, a fluorescência emitida quer pelo fármaco, quer pela proteína, é a estes comprimentos de onda desprezável.

11.2.1 Variação da anisotropia de fluorescência em presença da moxifloxacina

Após a preparação dos LUVs com sonda incorporada, do modo acima descrito, adicionou-se o adequado volume de solução de moxifloxacina (5 a 15 μM) ou de tampão Hepes, no caso de suspensões de referência, e procedeu-se a uma incubação de 30 minutos a 37 °C. Uma vez terminado este período de incubação, procedeu-se às leituras de anisotropia de fluorescência.

11.2.2 Variação da anisotropia de fluorescência em presença de OmpF

O efeito da inserção de OmpF sobre a fluidez da bicamada fosfolipídica foi testado, apenas, em proteolipossomas obtidos pelo método de incorporação em lipossomas pré-preparados.

Depois de preparada a suspensão de LUVs de DMPC com sonda incorporada, foram retiradas duas fracções. Uma das fracções seguiu o procedimento habitual de preparação de proteolipossomas com a adição de OmpF, posterior incubação e por fim remoção dos vestígios de detergente. A segunda fracção, usada como referência foi preparada exactamente do mesmo modo que a amostra, seguindo as mesmas etapas e diferentes incubações do procedimento, contudo não foi adicionada solução de proteína mas apenas igual volume em tampão Hepes com a mesma quantidade de oPOE. Após preparação da amostra e referência procedeu-se às leituras de anisotropia de fluorescência.

11.3 Alterações da fluidez membranar em presença da moxifloxacina avaliadas por RPE

As amostras e referência a utilizar nos estudos de espectroscopia de RPE foram preparadas da forma que a seguir descreve.

Para a incorporação das sondas 5-DS ou 16-DS, nas bicamadas fosfolipídicas dos LUVs de DMPC ou DMPG, preparou-se o filme lipídico partindo de uma solução clorofórmica (ou clorofórmio / metanol) de lípido e sonda na proporção molar de 1:100

(43,215-217). Após a preparação do filme conjunto contendo lípido e sonda, o procedimento de preparação de LUVs seguiu a metodologia habitual (item 3.).

As amostras foram preparadas em microtubo, por adição de um volume constante de suspensão lipossômica e volumes crescentes de solução de moxifloxacina em tampão Hepes ajustando-se o volume final de 1,0 ml com tampão Hepes. A referência foi preparada de igual modo, mas sem adição de fármaco. Seguidamente, amostras e referência foram incubadas, ao abrigo da luz, durante 30 minutos a 37 °C. A concentração final das sondas utilizadas nas amostras foi de $4,0 \times 10^{-5}$ M, tendo-se utilizado concentrações lipídicas na ordem dos $4,0 \times 10^{-3}$ M. A concentração final da moxifloxacina variou entre os 12,0 e os 60,0 µM.

Finalmente, amostras e referência foram injectadas em tubos capilares, e, posteriormente, colocadas em tubos de EPR a fim de se proceder ao traçado dos espectros, à temperatura constante de 37 °C, campo centrado a 3360 G, com um intervalo de varrimento de 100 G e uma frequência de modulação de 100 kHz. Para a sonda 5-DS aplicou-se uma amplitude de modulação de 3,97 G, uma potência de 25 mW e uma constante de tempo de 163,84 ms. Para a sonda 16-DS, a amplitude de modulação foi de 1,99 G, a potência aplicada de 20 mW e a constante de tempo de 81,92 ms. Para ambas as sondas os espectros foram adquiridos em modo cumulativo, tendo-se procedido a 18 varrimentos para a sonda 5-DS e 15 para a sonda 16-DS.

12. Interação das Quinolonas com OmpF: Estudos Espectroscópicos

12.1 Extinção da fluorescência de OmpF pela acrilamida e pelo ião iodeto na ausência e em presença das diferentes quinolonas

Procedeu-se à preparação de micelas mistas ou proteolipossomas, pelas metodologias anteriormente descritas. De seguida, mediu-se rigorosamente, um volume adequado de suspensão micelar ou de proteolipossomas para a célula de fluorescência a utilizar, no caso dos estudos em presença dos antibióticos é ainda adicionada quantidade constante de solução de antibiótico, e aferiu-se para um volume final de 1,0 ml com tampão Hepes. Após 2 min de estabilização da mistura, a 37 °C e sob agitação, fez-se a aquisição do espectro de fluorescência na ausência de agente de extinção. Seguidamente, procede-se a uma série de adições de 10,0 µl de solução de acrilamida ou iodeto de potássio, tendo-se

intercalado entre cada adição um período de 2 min de incubação sob agitação, ao fim do qual se procedeu à aquisição do espectro de fluorescência.

A concentração de acrilamida ou iodeto em cada ensaio variou entre 0,04 a 0,5 M. A concentração de OmpF, constante para cada ensaio, foi da ordem dos 0,45 μM . Nos ensaios efectuados em presença de quantidade constante de QN a concentração de antibiótico utilizada foi de 25 μM . A aquisição dos espectros de fluorescência efectuou-se com a amostra sob agitação constante, abertura de fenda de excitação e de emissão de 10,0 nm, velocidade de varrimento de 240 nm/min, ao comprimento de onda de excitação de 290 nm e no intervalo de emissão de 300-400 nm.

12.2 Constantes de Associação Quinolona /OmpF

A interacção entre OmpF e as quinolonas foi quantitativamente avaliada através da determinação de constantes de associação obtidas por espectroscopia de UV-Vis e de fluorescência para OmpF inserida em micelas mistas ou em LUVs de DMPC.

12.2.1 OmpF em micelas de oPOE: Espectroscopia de UV-Vis

As amostras foram preparadas por mistura de quantidade constante de suspensão micelar de oPOE (3 %) contendo OmpF, com volumes crescentes de solução de fármaco em tampão Hepes. As referências preparam-se da mesma forma mas substituindo a suspensão micelar contendo OmpF por igual volume de suspensão a 3 % de oPOE sem proteína. As amostras e referências foram sujeitas a agitação em vórtice e incubadas a 37 °C durante 30 minutos. Para cada ensaio utilizaram-se dois conjuntos de 8 a 12 microtubos (1,5 ml), correspondentes a 8 a 12 concentrações crescentes de antibiótico. As concentrações de antibiótico utilizadas variaram entre os 5 e 35 μM , tendo-se utilizado uma concentração de OmpF por ensaio de ~2,6 μM e uma quantidade de oPOE de 3 %. Após o período de incubação, traçaram-se os espectros de UV-Vis, à temperatura de 37 °C, em células de 1 cm de passo óptico, a uma velocidade de varrimento de 120 nm/min e num intervalo de comprimentos de onda de 230 a 450 nm.

12.2.2 OmpF em micelas mistas (oPOE / DMPC ou DMPG) ou em proteolipossomas

A preparação das micelas mistas ou dos proteolipossomas obedeceu a metodologias anteriormente descritas. Seguidamente, procedeu-se à medição rigorosa de adequado volume de suspensão micelar ou de proteolipossomas para a célula de fluorescência a

utilizar tendo-se completado o volume final de 1,0 ml com tampão Hepes. Após um período de 2 min de incubação a 37 °C, sob agitação, procedeu-se a uma série de 8 a 12 adições de adequado volume de solução de antibiótico em estudo. As adições de antibiótico foram intercaladas por 2 min de incubação sob agitação, ao fim da qual se procedia à aquisição do espectro de fluorescência.

Os espectros de emissão de fluorescência foram adquiridos sob agitação permanente, com abertura de fenda de excitação e emissão de 10,0 nm, velocidade de varrimento de 240 nm/min e ao comprimento de onda de excitação de 290 nm. Ao longo de todo o ensaio foram também traçados espectros de absorção de UV-Vis, de forma a obter a absorvância ao comprimento de onda de excitação antes das adições de fármaco e depois de cada adição.

12.3 Avaliação da transferência de energia de ressonância entre OmpF e a Ciprofloxacina

Para a avaliação da transferência de energia entre OmpF e a CP foram efectuadas adições sucessivas de um volume constante (10,0 µl) de solução de CP (~ 296 µM) para a célula de fluorescência contendo uma quantidade constante de OmpF incorporada em lipossomas de DMPC. O intervalo de concentrações de CP enquadrou-se entre os 0 e os 38 µM. Os espectros de fluorescência foram obtidos com um comprimento de onda de excitação de 290 nm.

Os efeitos de filtro interno e de diluição foram tidos em conta nos cálculos posteriores.

13. Estudos da Condutividade Eléctrica de OmpF em presença da Moxifloxacina e do Ácido Nalidíxico

As soluções de antibióticos foram preparadas com concentração ~10,0 mM, em tampão Tris (5 mM, pH 7,4) com 100 mM de KCl. O tampão utilizado para a maioria das determinações foi o tampão Tris, 5 mM, pH 7,4 e contendo 100 mM em KCl.

A célula de vidro utilizada, especialmente concebida para este fim, é constituída por dois compartimentos individuais (Figura II-1a) com capacidade para ~ 2,5 ml em cada um dos compartimentos.

Para a preparação da célula de trabalho unem-se as duas metades que a constituem, interpondo-se entre elas uma membrana de Teflon® (tetrafluoroetileno), de 25 µm de

espessura, na qual foi efectuado um orifício central, de 50-100 μm de diâmetro, por incisão orientada de raio laser (Fig.II-1b e 1c). O septo de Teflon[®] (Figura II-1b) que faz a separação do conteúdo dos compartimentos da célula, constitui a superfície de adesão dos fosfolípidos para a formação do bicamada lipídica. De modo a aumentar a sua hidrofobicidade, foi sujeito a um pré-tratamento dos contornos do orifício central por adição a ambos os lados da membrana de 1 μl de solução a 2 % de hexadecano em hexano, seguindo-se 30 min para evaporação do solvente. Posteriormente, adicionou-se a cada um dos compartimentos da célula, 2,5 ml de tampão Tris, seguidos de 5 μl de uma solução a 2,5 mg/ml de DPhPC numa mistura 1:9 de clorofórmio em hexano, e procedeu-se a 30min de espera para completa evaporação dos solventes orgânicos.

Após colocação da célula no interior de um conjunto de três gaiolas de Faraday (Figura II-2), os compartimentos da célula foram ligados com o circuito externo através de um par de eléctrodos Ag/AgCl.

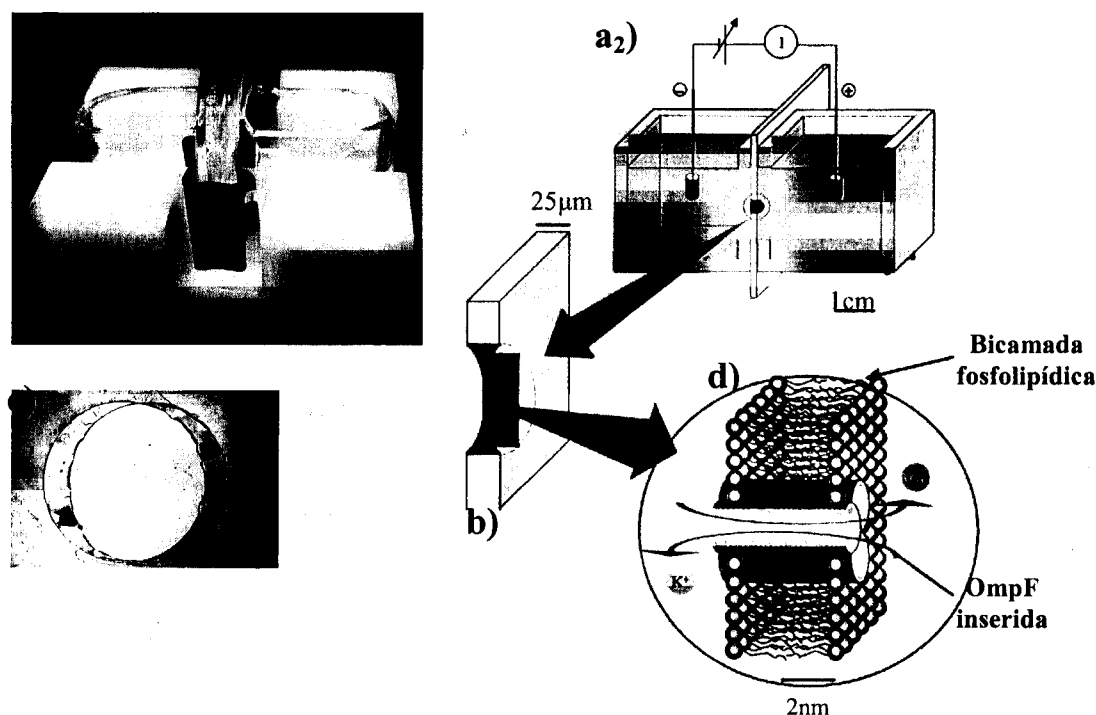


Figura II-1: Fotografia (a₁) e representação esquemática (a₂) da célula de trabalho das determinações de condutividade eléctrica de OmpF: b) septo de Teflon[®] que separa os compartimentos da célula; c) imagem de microscópio óptico do orifício central, do septo de separação, onde se forma a bicamada lipídica; d) representação da bicamada fosfolipídica com a porina incorporada.

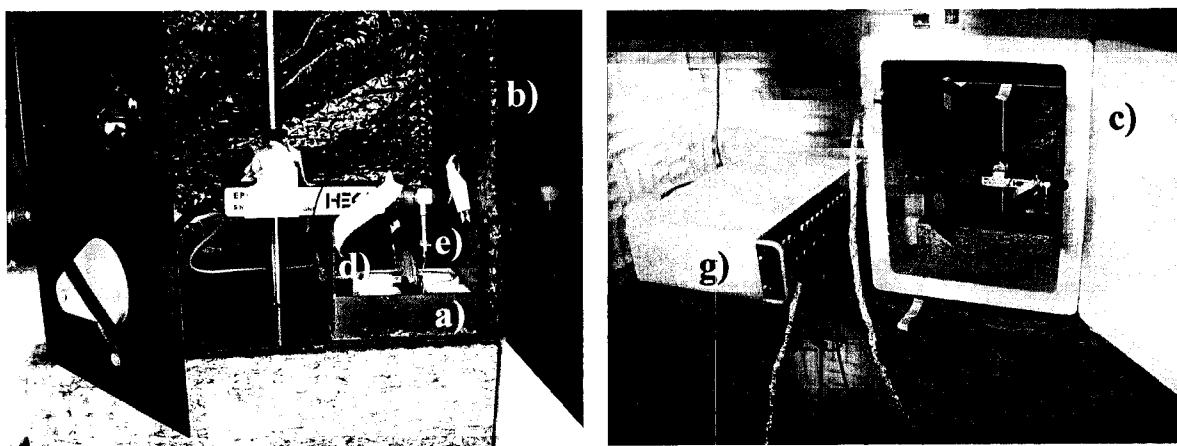


Figura II-2: Imagem da organização dos constituintes do dispositivo para as determinações de condutividade iónica: a), b) e c) gaiolas de Faraday; d) célula de vidro; e) eléctrodos; f) bancada de pedra isoladora; g) amplificador de sinal.

A formação da bicamada fosfolipídica planar, na superfície de Teflon[®], efectuou-se pela técnica de oposição de monocamadas lipídicas ⁽¹⁵⁶⁾ com algumas adaptações experimentais ⁽¹⁵⁸⁾. A bicamada lipídica resultou da lenta e gradual remoção/restituição do tampão dos compartimentos da célula, após formação da monocamada lipídica à superfície da fase aquosa.

A inserção de OmpF é efectuada por adição de 1 µl de solução diluída de porina (2,8 ng/ml) em tampão Tris (5 mM, pH 7,4, 1 % oPOE) a um dos compartimentos da célula. A incorporação da proteína na bicamada foi auxiliada por agitação e por aplicação de voltagem transmembranar na ordem dos 100-200 mV. A inserção membranar de OmpF foi detectada por marcado aumento da intensidade de corrente.

Seguiu-se o registo da intensidade de corrente iónica, através de OmpF, na ausência dos antibióticos e após cada adição de solução de antibiótico. As adições de antibiótico foram efectuadas de modo sistemático ao longo de cada estudo, iniciando-se com sucessivas adições ao mesmo lado de adição da proteína (lado *cis*), depois a ambos os compartimentos da célula, e por último ao lado oposto ao da adição de proteína (lado *trans*).

Todas as determinações deste tipo de estudo foram efectuadas à temperatura ambiente e em compartimento com controlo de humidade do ar e isolamento acústico.

***CAPÍTULO III:* OS RESULTADOS**

CAPÍTULO III: OS RESULTADOS

A resistência bacteriana à terapia antibacteriana constitui um problema emergente da sociedade dos nossos dias sendo o resultado directo de um uso excessivo e pouco ponderado dos antibióticos actualmente disponíveis e caminhando para um esgotamento das alternativas terapêuticas de que dispomos.

Uma das formas de resistência bacteriana mais difundidas é a impermeabilização das barreiras celulares bacterianas à entrada dos antibióticos, daqui resultando a necessidade de um perfeito conhecimento das diferentes vias de permeação membranar dos antibióticos para melhor se adequar a procura de novas estruturas às variações impostas pela bactéria.

É neste contexto que se enquadram os estudos efectuados que tiveram como objectivo o esclarecimento das vias de permeação membranar do grupo antibacteriano das quinolonas.

A análise da literatura na área da microbiologia aponta para uma intensificação da actividade antibacteriana e para um alargamento do espectro de acção das quinolonas em que a via de permeação membranar prevalente é a hidrofílica (porínica), contudo existem algumas evidências de um possível envolvimento da componente hidrofóbica ou mesmo da possibilidade da permeação das quinolonas ser o resultado da combinação de mais de uma via. Assim, os estudos realizados centraram-se no esclarecimento da contribuição de cada uma destas componentes para a permeação da membrana externa por cada uma das quinolonas estudadas.

1. Partição e Localização da Moxifloxacina em Lipossomas Unilamelares de DMPC e DMPG

Para que um fármaco seja dotado de actividade terapêutica para além de demonstrar elevada afinidade para o seu alvo de acção, tem ainda de ser capaz de ultrapassar as inúmeras barreiras membranares que se interpõe no seu trajecto até ao local de acção. No caso dos antibióticos, para além de uma farmacocinética favorável têm ainda de ser capazes de transpor as barreiras membranares bacterianas.

Actualmente, são propostas três principais vias de entrada das quinolonas na célula bacteriana do tipo de Gram (-): a via hidrofílica através da porina^(16, 218-220), a via “auto-promovida” por complexação dos catiões metálicos estabilizadores do LPS^(16, 221-223) e a via hidrofóbica por difusão através da bicamada⁽²²⁴⁻²²⁷⁾. Apesar de se considerar que, para as quinolonas das gerações mais recentes, a via de permeação através das porinas é a de maior importância, não existem quaisquer evidências de que a entrada neste tipo de bactéria se faça exclusivamente por essa via e portanto um envolvimento das restantes vias de permeação é sempre uma hipótese a ter em consideração^(222, 228). Paralelamente, as fluoroquinolonas mais recentes são caracterizadas por espectros de acção bastante alargados, que incluem estirpes bacterianas de Gram (+)⁽²²⁹⁻²³¹⁾ e mesmo bactérias com ultraestrutura celular distinta (*Mycobacterium tuberculosis*)⁽²³²⁻²³⁴⁾, em que a existência de diferentes invólucros membranares, e a ausência das porinas, força a entrada destas moléculas por vias alternativas, assim uma possível justificação para o alargamento do seu espectro de actividade poderá residir nesta capacidade, não específica, em transpor diferentes barreiras bacterianas. Neste contexto, uma melhor percepção dos mecanismos de entrada destes antibióticos nas células bacterianas passa necessariamente por uma avaliação da sua interacção com modelos membranares como os lipossomas, capazes de mimetizar química e estruturalmente o ambiente anisotrópico das membranas celulares mas cuja possibilidade de controlo de características e ausência de outros componentes intervenientes no processo de transposição membranar, nos permite obter informação mais detalhada sobre a entrada das quinolonas na célula bacteriana através do estudo da sua partição e localização membranar.

1.1 Coeficientes de partição da moxifloxacina entre uma solução aquosa e vesículas lipossômicas de DMPC e DMPG

A determinação da partição dos fármacos entre o meio aquoso e o meio membranar de vesículas lipossômicas tem vindo a ser utilizada como forma de averiguar, não só a maior ou menor afinidade dos fármacos para ambientes hidrófobos, mas também o tipo e extensão de possíveis interacções entre estes e os mais variados ambientes membranares^(11, 235-237). Nesta perspectiva, e dada a relevância desta informação no esclarecimento das vias de permeação membranar das quinolonas, procedeu-se à determinação das constantes de partição da moxifloxacina entre o meio aquoso e o meio membranar das vesículas de DMPC e DMPG.

Os estudos de partição foram sempre realizados recorrendo a uma fase membranar constituída por uma população homogénea de vesículas lipossômicas unilamelares, com tamanho padronizado, por extrusão, para os 100 nm.

Os coeficientes de partição da moxifloxacina entre os referidos meios membranares e o meio aquoso foram determinados por espectrofotometria derivativa de UV-Vis e, posteriormente, aferidos quanto à exactidão dos valores obtidos, por espectroscopia de fluorescência.

As concentrações de fármaco utilizadas nos ensaios de espectrofotometria de UV-Vis e nos ensaios de espectroscopia de fluorescência foram seleccionadas após determinação dos intervalos de concentração de moxifloxacina, em tampão Hepes, que verificam a lei de Lambert-Beer, para cada uma das técnicas. Os intervalos de concentrações obtidos encontram-se descritos na tabela III-1:

	Concentração (µM)
Espectrofotometria UV-Vis	2,0-40,1
Espectroscopia de fluorescência	1,0-18,1

Tabela III-1: Intervalos de concentração onde se verifica a lei de Lambert-Beer para a MX em tampão Hepes. Valores obtidos ao comprimento de onda de máxima absorção/emissão.

1.1.1 Espectrofotometria de UV-Vis

A aplicação deste tipo de metodologia à determinação do coeficiente de partição de uma qualquer molécula tem por base a existência de alterações aos parâmetros de absorção dessa molécula por sua incorporação em ambiente membranar⁽¹²⁰⁾.

Apesar da simplicidade do conceito, a sua directa aplicabilidade é normalmente limitada a sistemas que apresentem reduzida dispersão luminosa, como acontece nos

sistemas micelares. As suspensões de LUVs de DMPC e DMPG utilizadas nestes estudos causam acentuada dispersão de Rayleigh, notada ao longo de todo o traçado dos espectros de absorção mas de forma mais acentuada a menores comprimentos de onda ⁽²³⁸⁾. As vesículas unilamelares de DMPG, provavelmente em consequência das repulsões electrostáticas entre as vesículas ⁽²³⁹⁾, apresentaram uma intensidade dispersiva sempre inferior à demonstrada por suspensões de concentração semelhante em vesículas unilamelares de DMPC (Figura III-1).

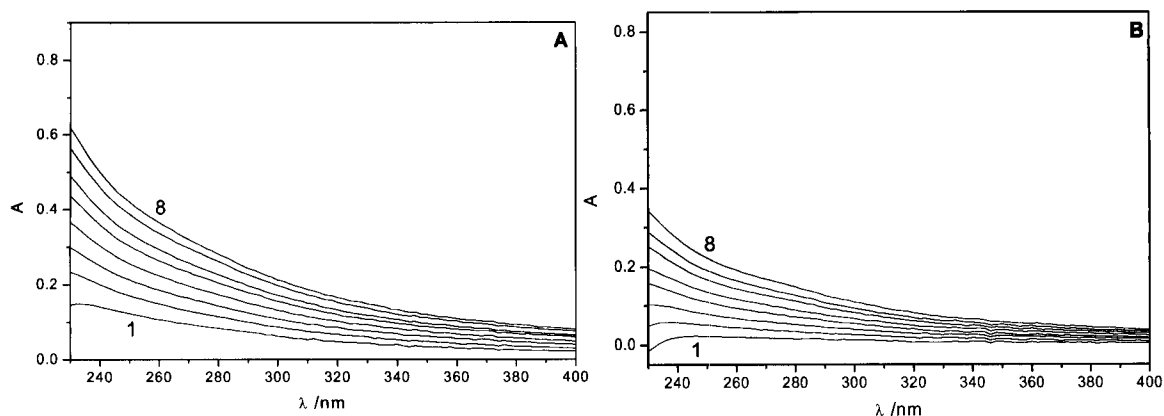


Figura III-1: Dispersão de luz causada por suspensões de LUVs de DMPC (A) e DMPG (B) em tampão Hepes, de concentrações (μM): (A) (1) 261; (2) 385; (3) 448; (4) 545; (5) 655; (6) 796; (7) 898; (8) 998; (B) (1) 250; (2) 330; (3) 420; (4) 520; (5) 630; (6) 790; (7) 880; (8) 990.

Como se pode observar na Figura III-2, em presença de concentrações crescentes de vesículas lipossômicas, os espectros de UV-Vis da moxifloxacina evidenciam acentuadas interferências espectrais.

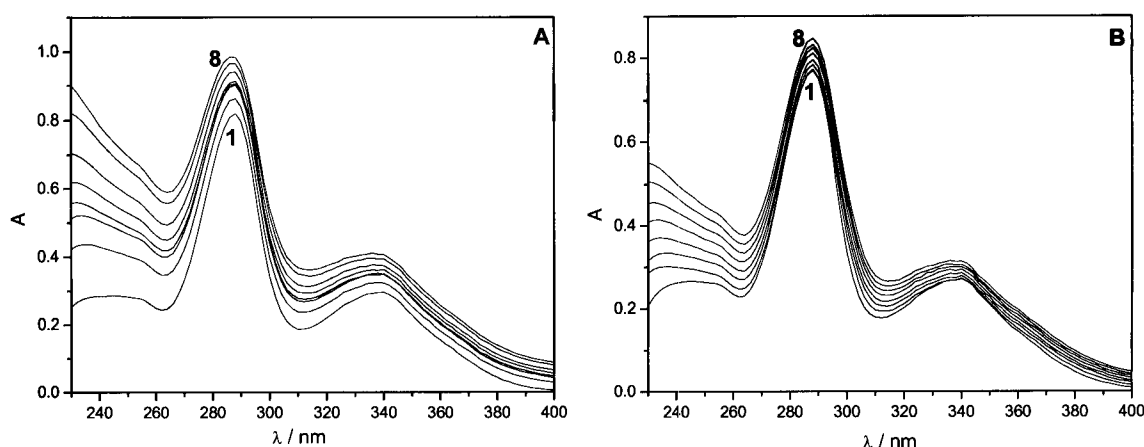


Figura III-2: Espectros de absorção da moxifloxacina ($30,0 \mu\text{M}$) na presença de concentrações crescentes de LUVs de DMPC (A) e DMPG (B). Ver concentrações Figura III-1.

Numerosos estudos envolvendo determinações espectrofotométricas em meios igualmente dispersivos referem uma minimização do problema recorrendo à espectrofotometria derivativa. Na realidade, a simplicidade de aplicação, o seu elevado poder de resolução e as inúmeras vantagens na eliminação de interferências espectrais e resolução de bandas sobrepostas ou pouco diferenciadas, têm conduzido à sua crescente utilização nas mais variadas situações experimentais ^(125, 213, 240-242).

Contudo, no caso concreto em estudo, a derivação dos espectros das amostras permite apenas uma eliminação parcial deste tipo de interferência (Figura III-3A), tendo sido necessário associar uma correcção inicial por subtracção dos espectros das referências aos espectros das amostras, para se obter uma razoável anulação dos sinais de fundo. Por outro lado, note-se que esta subtracção das suspensões de referência por si só também não permite uma total eliminação da dispersão de luz (Figura III-3B), fenómeno particularmente relevante a comprimentos de onda menores onde o efeito dispersivo da luz é maior.

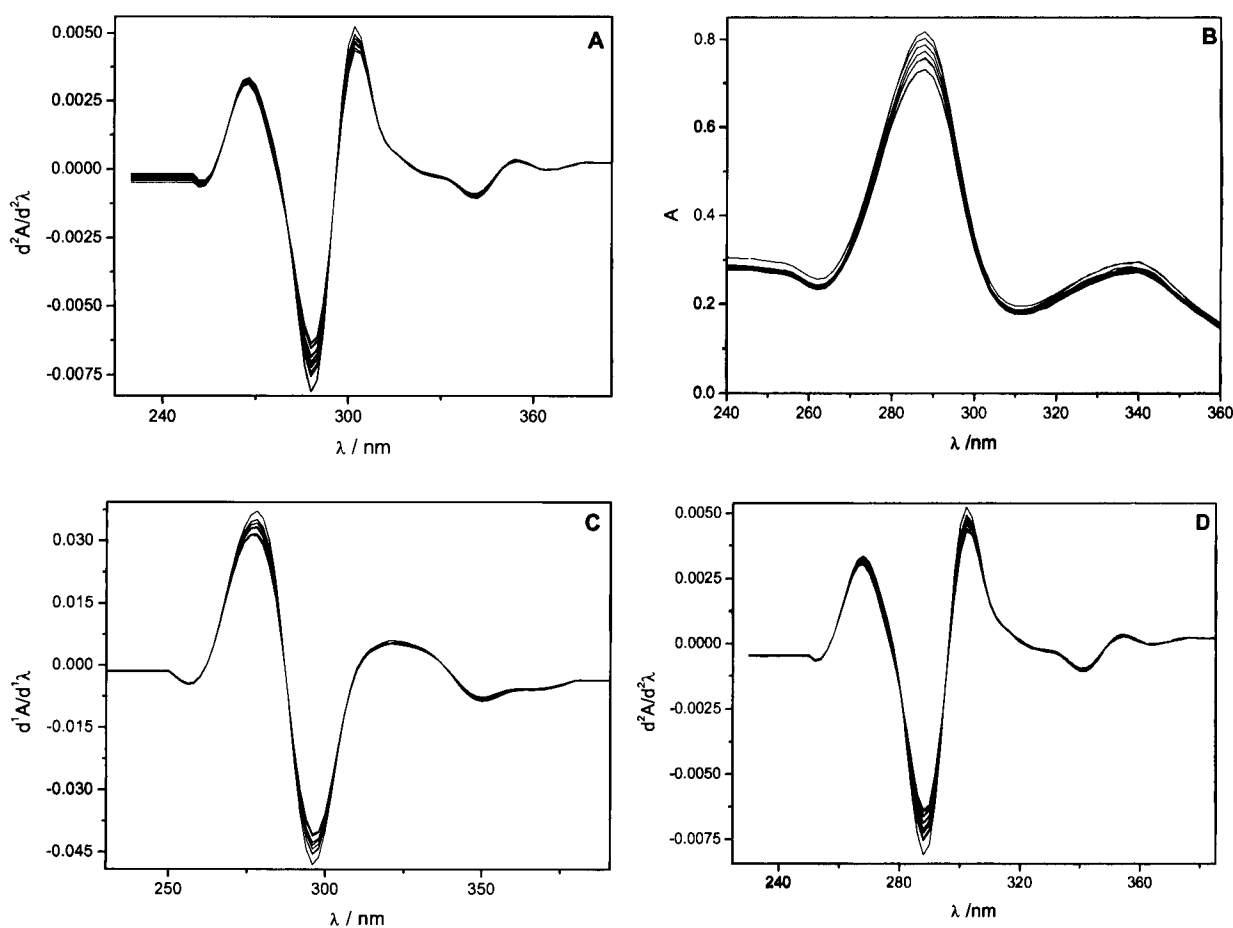


Figura III-3: Espectro de segunda derivada da moxifloxacina, sem subtracção das referências (A), espectros de subtracção de ordem zero (B), espectros, após subtracção, de primeira derivada (C) e de segunda derivada (D).

A análise dos gráficos da Figura III-3 permite verificar que na primeira e segunda derivada dos espectros de subtração (Figura III-3C e D) há uma eliminação total das interferências espectrais causadas pelas vesículas lipossômicas, embora se note uma melhor resolução de bandas com a segunda derivada. Assim, para o cálculo dos coeficientes de partição da moxifloxacina entre as vesículas lipossômicas e o meio aquoso de tampão Hepes, utilizaram-se os espectros de segunda derivada.

Nos vários ensaios efectuados experimentaram-se várias concentrações de antibiótico, não se tendo notado alterações significativas nos valores de K_p obtidos.

Espectros de ordem zero. Os espectros de subtração da moxifloxacina em presença de concentrações crescentes quer de DMPC, quer de DMPG (Figura III-4) mostram um decréscimo na intensidade de absorção, fenómeno associado a um provável decréscimo da concentração do fármaco em fase aquosa correspondente à sua partição por ambiente membranar.

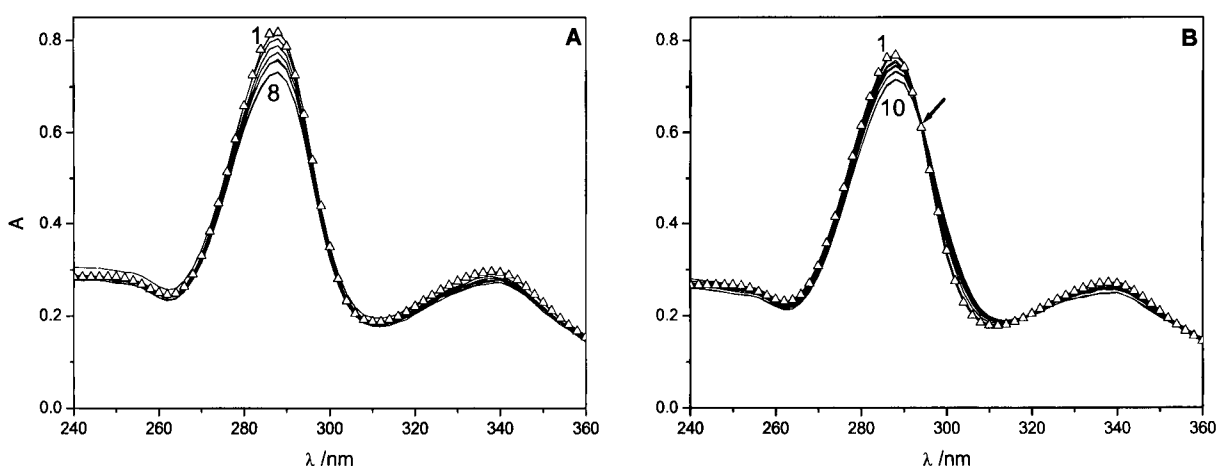


Figura III-4: Espectros de absorção da moxifloxacina (20 μM) na presença de (A) concentrações crescentes de LUVs de DMPC (μM): (1) 0; (2) 261; (3) 385; (4) 448; (5) 545; (6) 655; (7) 796; (8) 898. e de (B) concentrações crescentes de DMPG (μM): (1) 0; (2) 100; (3) 180; (4) 270; (5) 360; (6) 430; (7) 530; (8) 640; (9) 720; (10) 900. Espectro da moxifloxacina na ausência de lípido encontra-se assinalado com o símbolo (Δ).

A forma espectral correspondente ao fármaco em ambiente membranar não é nestes espectros evidente, pois não são notados quaisquer desvios do comprimento de onda máximo em presença de nenhum dos lípidos. Porém, no caso do DMPG destaca-se a presença de um ponto isobéstico a 294 nm que constitui evidência da presença da

moxifloxacinina em pelo menos duas formas distintas: livre na fase aquosa polar e na forma ligada às membranas lipídicas^(11, 150, 241-243).

Note-se ainda que a diminuição da absorção com o aumento da concentração de lípido só acontece de forma regular na zona do máximo de absorção, enquanto nas restantes zonas do espectro se verifica uma mistura de espectros sugestiva de uma má eliminação das interferências espectrais resultantes da presença dos lipossomas.

Espectros de segunda derivada. Os espectros de segunda derivada obtidos a partir dos espectros de absorção da moxifloxacinina, após subtração das referências, demonstram as mesmas características espectrais já descritas para os espectros de ordem zero mas de uma forma mais pronunciada como resultado de uma melhor resolução de bandas característica do processo de derivação espectral (Figura III-5). A variação da intensidade de absorção com o aumento da concentração lipídica é agora muito mais evidente sendo notada em toda a extensão do espectro. Realça-se ainda a presença de três pontos isobésticos nitidamente observáveis nos espectros da moxifloxacinina, a 280, 294 e 307 nm, quer em presença de concentrações crescentes de DMPC como para o DMPG, (Figura III-5A e B, respectivamente), indicadores de uma total eliminação dos efeitos dispersivos por presença das vesículas lipossômicas, mas também confirmando a coexistência dos dois estados do fármaco: livre em solução aquosa de tampão Hepes e associado à bicamada das vesículas.

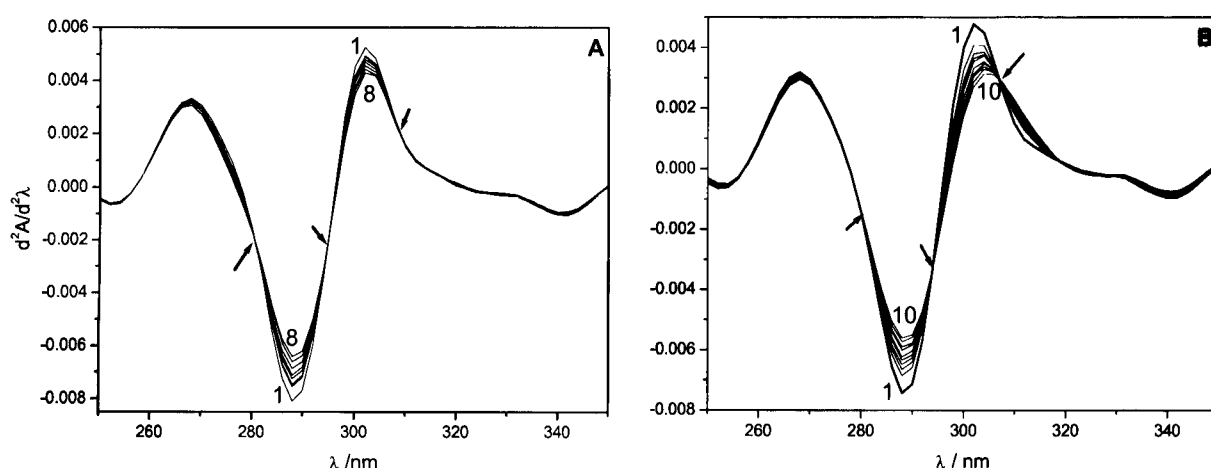


Figura III-5: Segunda derivada dos espectros de absorção da moxifloxacinina na ausência (1) e em presença (8 ou 10) de concentrações crescentes de LUVs de DMPC (A) e de DMPG (B). Ver concentrações na Figura III-4. Pontos isobésticos assinalados por (→).

Note-se que nos espectros de ordem zero da moxifloxacinina em presença de concentrações crescentes de DMPC não se verificou a existência de qualquer ponto

isobéstico, detalhe espectral só evidenciado com a derivação. Por outro lado, nos espectros de segunda derivada da moxifloxacina em presença de LUVs de DMPG é agora evidente um ligeiro desvio batocrômico (2,0 nm) dos comprimentos de onda máximos, o que vem revelar a existência de uma segunda forma espectral do fármaco, não detectável no espectro de ordem zero, e que corresponde à forma com ligação membranas. Este tipo de ocorrência vem mais uma vez realçar a importância da espectrofotometria derivativa no esclarecimento de detalhes espectrais de reduzida intensidade.

Cálculo dos coeficientes de partição. Os valores dos coeficientes de partição (K_p) foram obtidos por ajuste não linear da equação (1.5) aos valores experimentais obtidos (ΔD versus $[L]$), para uma dada concentração de moxifloxacina. Os valores de ΔD resultam da diferença entre o valor da derivada da absorvância do espectro da moxifloxacina na ausência, e em presença de concentrações crescentes de cada um dos lípidos, a um dado comprimento de onda.

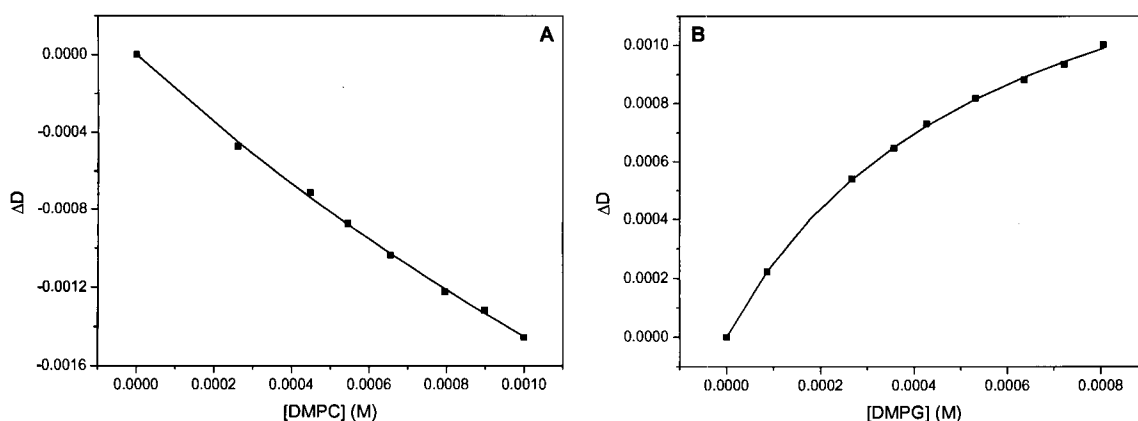


Figura III-6: Ajuste da equação (1.5) aos dados experimentais obtidos, pelo método da regressão não linear. Valores relativos à segunda derivada dos espectros de absorção da moxifloxacina em presença de concentração crescentes de DMPC, ao comprimento de onda de 288 nm (A), e de DMPG ao comprimento de onda de 302 nm (B).

A curva ΔD versus $[L]$ tem forma hiperbólica (Figura III-6) com tendência para um mínimo ou para um máximo consoante o comprimento de onda a que se faz a determinação, e correspondendo à situação de saturação membranas por ligação dos fármacos.

Por princípio, o cálculo da K_p pode ser efectuado a partir dos valores ΔD obtidos a um qualquer comprimento de onda do espectro. Contudo, se as determinações forem efectuadas aos $\lambda_{\max}$ e $\lambda_{\min}$ dos espectros de segunda derivada, obtém-se um aumento na

razão sinal/ruído e uma maior reprodutibilidade nos valores de $\Delta D^{(240, 241)}$. Assim, os K_p da moxifloxacina foram calculados a partir dos valores de ΔD aos λ_{max} e λ_{min} dos espectros de segunda derivada, e adicionalmente, como forma de avaliar a reprodutibilidade dos resultados foram também utilizados dados relativos a outros comprimentos de onda.

Os valores dos coeficientes de partição da moxifloxacina entre a fase aquosa e a fase membranar de DMPC e DMPG estão reunidos na Tabela III-2. Os valores apresentados correspondem à média e respectivo desvio padrão de pelo menos três ensaios independentes.

	DMPC	DMPG
Coeficientes de partição K_p (M^{-1})	256 ± 7	1214 ± 272

Tabela III-2: Coeficientes de partição da moxifloxacina entre uma fase aquosa de tampão Hepes e a fase lipídica membranar de DMPC e DMPG, obtidos por espectrofotometria derivativa de UV-Vis.

1.1.2 Espectroscopia de fluorescência

Tendo em conta que a moxifloxacina é um fármaco dotado de propriedades fluorescentes, a confirmação dos resultados de partição obtidos por espectrofotometria derivativa foi efectuada por espectrofluorimetria.

Nas condições experimentais utilizadas, as interferências espectrais por presença das vesículas unilamelares de DMPC e DMPG sobre o espectro de emissão da moxifloxacina são bastante reduzidas (Figura III-7), pelo que a sua total eliminação é obtida por subtração das suspensões de referência.

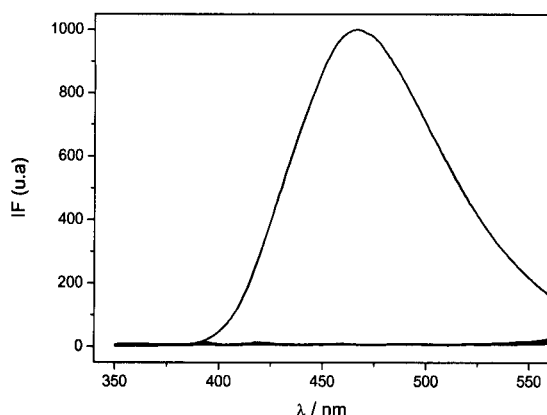


Figura III-7: Espectro de emissão da moxifloxacina em tampão Hepes, e de suspensões de referência de concentrações crescentes de vesículas unilamelares de DMPC em Hepes (250 μM a 1000 μM). Espectros obtidos após excitação a 288 nm.

As propriedades espectroscópicas de um fluoróforo são altamente dependentes do meio que o envolve, assim, o coeficiente de partição de uma molécula fluorescente entre uma

fase aquosa e o meio membranar pode facilmente ser avaliado desde que a alteração do meio envolvente provoque mudanças numa das suas propriedades de fluorescência. Na presença de concentrações crescentes de LUVs de DMPC e DMPG o espectro de emissão da moxifloxacina sofre alterações, mais acentuadas quando em presença do DMPG (Figura III-8).

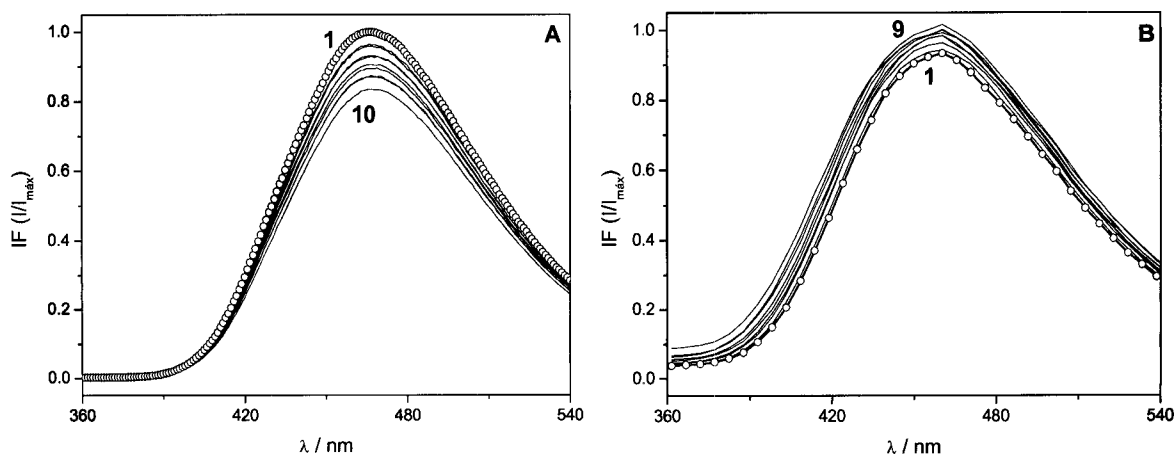


Figura III-8: Espectros de emissão de fluorescência da moxifloxacina (10 µM) na ausência (1) e na presença (2-10 ou 2-9) de concentrações crescentes de DMPC (A) e DMPG (B). Concentrações de DMPC (µM): (1) 0; (2) 193; (3) 298; (4) 408; (5) 494; (6) 601; (7) 708; (8) 798; (9) 902; (10) 1008. Concentrações de DMPG (µM): (1) 0; (2) 60; (3) 140; (4) 280; (5) 506; (6) 600; (7) 709; (8) 807. Comprimento de onda de excitação de 288 nm.

Os espectros de emissão da moxifloxacina mostram um decréscimo da intensidade de fluorescência à medida que aumenta a concentração de DMPC, contudo em presença de quantidades crescentes de DMPG verificou-se um aumento da intensidade fluorescência. O aumento do rendimento quântico de fluorescência do fármaco em presença da fase lipídica constitui indicação da sua partição no meio membranar⁽³⁹⁾ e a sua ocorrência apenas em presença de DMPG confirma os resultados de espectroscopia de UV-Vis, apontando para uma partição muito superior neste lípido em relação ao DMPC, e sugerindo assim uma prevalência das forças electrostáticas relativamente às interações hidrofóbicas no processo de partição⁽¹³¹⁾. Relativamente ao decréscimo da intensidade de fluorescência perante as vesículas de DMPC, este reflecte apenas a diminuição da concentração do antibiótico na fase aquosa não sendo detectável a contribuição espectral da fracção membranar o que mais uma vez corrobora o reduzido valor da K_p da moxifloxacina em DMPC.

Paralelamente, salienta-se a ausência de desvios ao $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão do fármaco em presença dos lipossomas de DMPC e DMPG, facto sugestivo de uma interacção membranar na zona de interface, isto é, nas regiões polares das vesículas lipossómicas⁽³⁹⁾.

Cálculo dos coeficientes de partição. O cálculo dos coeficientes de partição foi efectuado por ajuste não linear da equação (2.2) aos valores experimentais obtidos (ΔIF versus $[L]$). Os valores de ΔIF são obtidos por diferença dos valores de intensidade de fluorescência da moxifloxacina só e em presença de concentrações crescentes de lípido, ao $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão de 466 nm (Figura III-9).

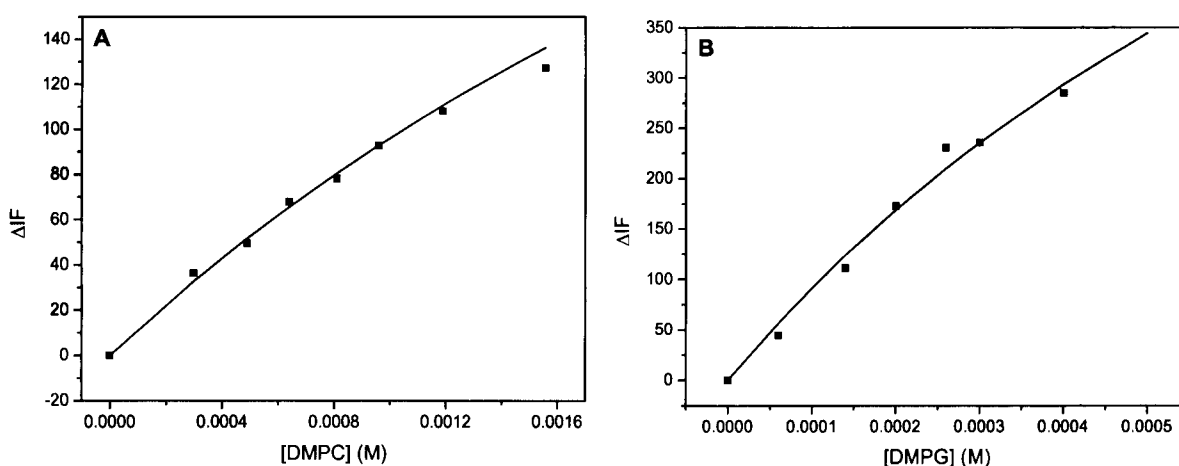


Figura III-9: Ajuste não linear da equação (2.2) aos valores experimentais obtidos de intensidade de fluorescência da moxifloxacina, ao $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão de 466 nm, em presença de concentração crescentes de DMPC (A) e DMPG (B).

Na tabela III-3 estão dispostos os valores de K_p da moxifloxacina em DMPC e DMPG, obtidos por espectrofluorimetria. Os valores representados correspondem à média e respectivo desvio padrão de pelo menos três ensaios independentes.

	DMPC	DMPG
Coeficientes de partição K_p (M^{-1})	232 ± 62	1223 ± 3

Tabela III-3: Coeficientes de partição da moxifloxacina entre uma fase aquosa de tampão Hepes e a fase lipídica membranar de DMPC e DMPG, obtidos por espectrofluorimetria.

Da análise das Tabelas III-2 e III-3 pode verificar-se que os valores de K_p obtidos por espectrofotometria derivativa de UV-Vis e espectrofluorimetria são, a menos de erro experimental, idênticos. Assim, realça-se a aplicabilidade da espectrofluorimetria para este tipo de determinação e com a mais valia de demonstrar menos problemas associados à dispersão de luz pela presença das vesículas lipossômicas.

1.2 Localização da Fluoroquinolona Moxifloxacina em Lipossomas de DMPC e DMPG

Da abordagem inicial de determinação dos coeficientes de partição apenas se obtiveram evidências de que a interacção da moxifloxacina com estruturas membranares acontece predominantemente ao nível da interface das vesículas com a fase aquosa. Para um melhor esclarecimento da importância da componente lipídica na entrada deste fármaco na célula bacteriana, torna-se necessário o conhecimento da zona membrana em que ocorre esta interacção, de forma a se diferenciar uma interacção superficial, provavelmente relacionada com um passo inicial de adsorção e orientação molecular ou de destabilização membrana, de uma capacidade intrínseca de difusão através da bicamada, dedutível de uma localização a maior profundidade membrana. Este esclarecimento da posição e orientação da moxifloxacina na membrana é também de grande importância para a percepção da sua interacção com moléculas de localização membrana tais como proteínas responsáveis pelo seu efluxo para o exterior bacteriano e portanto associadas a novas formas de resistência, ou os canais porínicos, como OmpF, a que se associa um aumento da sua facilidade de entrada nas bactérias de Gram (-). Em última análise, a localização membrana de um fármaco permite uma melhor compreensão da relação estrutura/actividade essencial no desenho de novas moléculas com maior potência antibacteriana e menores problemas de resistência bacteriana.

1.2.1 Espectroscopia de Fluorescência

Para a localização membrana da moxifloxacina por espectroscopia de fluorescência, recorreu-se a fenómenos de extinção da fluorescência do próprio fármaco e a estudos de anisotropia de fluorescência de sondas incorporadas na membrana em localização perfeitamente conhecida. Nos estudos de extinção da fluorescência da moxifloxacina recorreu-se ao ião iodeto como agente de extinção, relativamente aos estudos de anisotropia de fluorescência estes foram efectuados recorrendo às sondas DPH e TMA-

DPH, com determinações a várias temperaturas de forma a permitir simultaneamente à localização do fármaco, uma avaliação das alterações de fluidez e temperatura de transição de fase das membranas.

1.2.1.1 Extinção da fluorescência da moxifloxacina pelo ião iodeto

Informação sobre a localização da moxifloxacina na membrana pode ser obtida através da extinção da fluorescência intrínseca desta molécula pelo ião iodeto, um agente de extinção hidrossolúvel, cujo efeito sobre as propriedades de fluorescência do fármaco se faz revelar principalmente sobre a fracção em fase aquosa.

O intervalo de concentrações de KI usado (0,005 a 0,2 M), foi estabelecido tendo-se em consideração uma observação o mais alargada possível do fenómeno de extinção de fluorescência em análise, mas também a garantia de ausência de alterações de estrutura lipídica membranar descritas para situações em que se recorrem a concentrações mais elevadas de KI⁽²⁴⁴⁾.

Na Figura III-10 destacam-se os resultados relativos à extinção de fluorescência da moxifloxacina pelo ião iodeto, na ausência e em presença de concentrações crescentes de vesículas unilamelares de DMPC e DMPG.

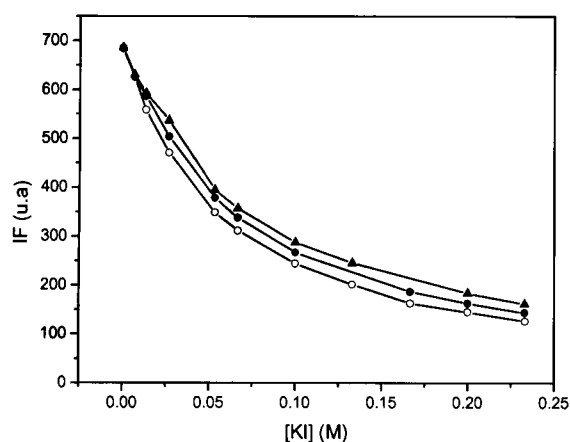


Figura III-10: Variação da intensidade de fluorescência da moxifloxacina (3,4 μ M) em função da concentração de KI, na ausência ($\circ$) e em presença de 500 μ M de DMPC ($\bullet$) e DMPG ($\blacktriangle$). Comprimento de onda de excitação de 288 nm e monitorização da fluorescência a 468 nm.

O aumento da concentração de ião iodeto induz um decréscimo na intensidade de fluorescência da moxifloxacina quer na ausência como em presença das vesículas lipossômicas, porém este decréscimo torna-se mais acentuado na ausência da fase lipídica.

A análise do processo de extinção de fluorescência foi efectuada de acordo com a equação de Stern-Volmer (Capítulo I, 3.0). A relação de Stern-Volmer para a variação da intensidade de fluorescência em função da concentração do KI revela um comportamento linear (Figura III-11), sugestivo de um único processo de extinção de fluorescência, que

uma vez associado à ausência de alterações espectrais por presença do iodeto, nos permite concluir tratar-se de um processo de extinção de fluorescência do tipo dinâmico (Figura III-12).

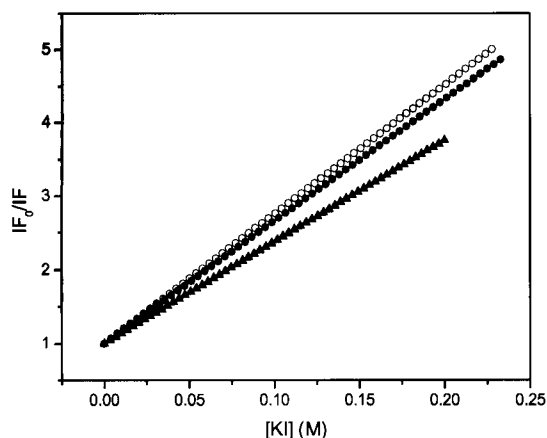


Figura III-11: Representação gráfica da equação Stern-Volmer para a desativação de fluorescência da Moxifloxacina pelo ião iodeto, em tampão Hepes na ausência (○) e em presença de LUVs de DMPC (●) e DMPG (▲), 500 μ M.

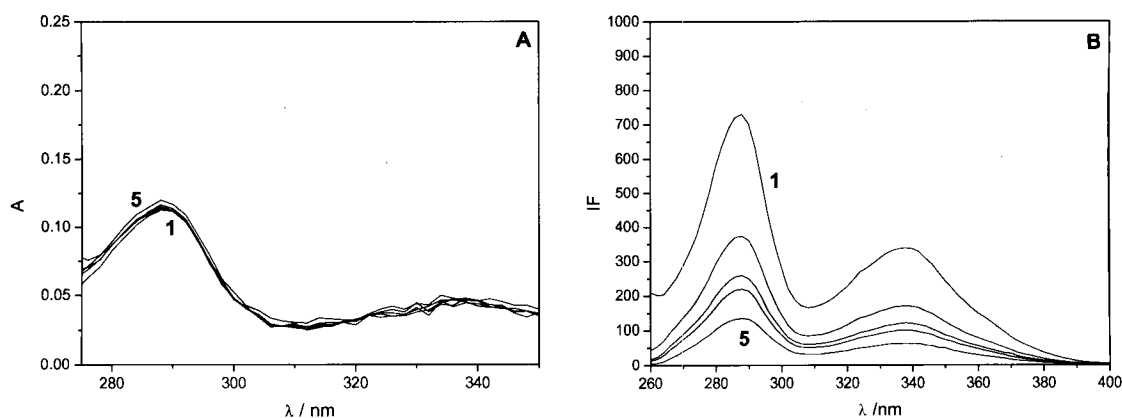


Figura III-12: Espectros de absorção (A) e de excitação de fluorescência (B) da moxifloxacina na presença de concentrações (M) crescentes de ião iodeto (1-5): (1) 0,0; (2) 0,03; (3) 0,07; (4) 0,11; (5) 0,23.

A presença da componente lipídica provoca um decréscimo nos valores da constante de Stern-Volmer na ordem: moxifloxacina em solução aquosa de tampão Hepes > moxifloxacina em presença de LUVs de DMPC > moxifloxacina em presença de LUVs de DMPG. A variação observada vem de encontro ao que seria de prever tendo em consideração os coeficientes de partição obtidos, pois quanto maior a partição do fármaco pela fase membrana, menor a sua acessibilidade ao iodeto. As diferenças na intensidade de fluorescência da moxifloxacina livre ou incorporada nos lipossomas reflectem a partição do fármaco pelas diferentes fases. No caso do fármaco livre em solução, praticamente todos os fluoróforos estão acessíveis ao iodeto, na situação em que parte do antibiótico está incorporado nos lipossomas apenas a fracção de moléculas que permanece livre em solução, ou ligada na zona de interface lipossoma/água, continua acessível ao iodeto.

Assim, a existência de uma população de fluoróforos não acessível ao iodeto revela a presença de parte das moléculas de antibiótico em localização mais interna da bicamada fosfolipídica dos lipossomas.

Os valores das constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) calculados a partir dos declives das rectas IF_0/IF vs $[KI]$, para a extinção de fluorescência da moxifloxacina pelo ião iodeto, em presença de diferentes concentrações de cada um dos lípidos, encontram-se sumariados na Tabela III-4. Os valores expostos correspondem à média e respectivo desvio padrão de pelo menos três conjuntos de ensaios independentes, cada um com um conjunto de amostras igual ou superior a 8. As rectas obtidas para a relação de Stern-Volmer, em cada uma das situações expostas, apresentaram sempre coeficientes de correlação linear iguais ou superiores a 0,999.

DMPC (μM)	$K_{SV} (M^{-1})$	DMPG (μM)	$K_{SV} (M^{-1})$
250	$16,7 \pm 0,2$	250	$15,3 \pm 0,1$
500	$16,8 \pm 0,3$	500	$15,9 \pm 0,2$
700	$16,5 \pm 0,2$	700	$14,0 \pm 0,3$
Moxifloxacina em solução aquosa de tampão Hepes: $K_{SV} = 17,5 \pm 0,2 M^{-1}$			

Tabela III-4: Valores das constantes de Stern-Volmer para a extinção de fluorescência da moxifloxacina pelo ião iodeto, na ausência e em presença de LUVs de DMPC e DMPG.

A ligeira diminuição dos valores de K_{SV} com o aumento da concentração de lípido poderá relacionar-se não só com a redução da fracção acessível de fluoróforo, consequência de uma maior superfície de partição, como também com uma certa diluição do ião iodeto na fase lipídica das suspensões com consequente redução da sua concentração em solução aquosa⁽³⁹⁾. No caso da presença de LUVs de DMPG, o referido decréscimo é ainda mais acentuado do que o verificado para o DMPC, o que confirma a coexistência dos dois efeito descritos já que a partição do fármaco em DMPG é, como já se referiu, bastante superior à verificada para o DMPC e paralelamente apesar da provável repulsão electrostática entre o iodeto e as vesículas de DMPG, essa repulsão tende a ser superada pelo facto de as bicamadas de fosfolípido aniónico apresentarem um menor empacotamento na região das cabeças polares o que facilita a penetração membranar do ião iodeto⁽⁴³⁾.

Adicionalmente, note-se que a constante de partição da moxifloxacin em DMPG é cerca de cinco vezes superior à obtida para o DMPC, porém o decréscimo no valor da constante de Stern-Volmer por presença das vesículas de DMPG não traduz uma diferença tão significativa. Uma possível explicação para esta constatação poderá relacionar-se com a capacidade do ião iodeto em aceder não só a fluoróforos em ambiente hidrofílico mas também na zona de interface membranar ⁽²⁴⁵⁾ o que faria antever uma localização do fármaco maioritariamente a este nível, e daí o decréscimo pouco acentuado da constante de Stern-Volmer, com uma pequena fracção, correspondente à parte inacessível ao iodeto, de localização a um nível membranar mais interno.

1.2.1.2 Anisotropia de Fluorescência

A anisotropia de fluorescência quantifica a intensidade de rotação molecular de um fluoróforo durante o tempo de vida do seu estado excitado, sendo a rotação molecular condicionada pela resistência imposta pelo meio em que este se encontra, os valores de anisotropia serão influenciados não só pela forma e tamanho do fluoróforo como também pelas características do meio em que este se insere ⁽⁴¹⁾. Assim, sendo a anisotropia um parâmetro molecular sujeito a aumentos sempre que o fluoróforo tenha a mobilidade restringida, como acontece em ambientes membranares, a anisotropia de um fluoróforo inserido neste tipo de ambiente constitui uma via de obter informação sobre possíveis alterações decorrentes da presença de moléculas estranhas a uma dada organização membranar, o que justifica a extensa aplicação desta metodologia no estudo da interacção membranar de fármacos.

A presença de moléculas de uma qualquer substância extrínseca à composição membranar tem como consequência a alteração das características estruturais da membrana na área em que esta se insere. A exploração das alterações às características de organização e fluidez membranar pode ser efectuada por estudos de anisotropia de fluorescência recorrendo-se para esse efeito à incorporação membranar de sondas de fluorescência de propriedades espectroscópicas e localização na membrana perfeitamente conhecidos. O movimento destas sondas membranares irá reflectir-se nos valores de anisotropia de fluorescência, assim, valores elevados de anisotropia estão associados a uma elevada ordem estrutural, enquanto que baixos valores de anisotropia reflectem um estado de elevada fluidez membranar. Ou seja, características membranares, como a fluidez e temperatura de transição de fase, de diferentes regiões da membrana poderão ser obtidos a partir da determinação da anisotropia e ser usadas como indicadores de alterações

introduzidas pela presença, por exemplo, de um fármaco em determinado ambiente membranar.

Os efeitos membranares decorrentes da presença da moxifloxacina na bicamada de LUVs de DMPC e DMPG foram investigados com recurso à incorporação membranar das sondas de fluorescência DPH e TMA-DPH (características e pormenores de localização discutidas no Capítulo I- item 4.2.2.1). A localização do TMA-DPH na zona das cabeças polares dos fosfolípidos permitirá obter informação de alterações ocorridas na interface lipossoma/água, enquanto que o DPH com localização mais interna ao nível das cadeias carbonadas permitirá aceder às alterações sentidas no interior hidrofóbico da membrana.

A proporção molar de sonda/lípido utilizada nestes estudos foi de 1:300, tendo-se excluído proporções superiores para se evitarem fenómenos de alteração membranar⁽⁴³⁾.

A variação, em função da temperatura, da anisotropia de fluorescência das sondas DPH e TMA-DPH, incorporadas em LUVs de DMPC e DMPG, na ausência e em presença da moxifloxacina, está representada na Figura III-13.

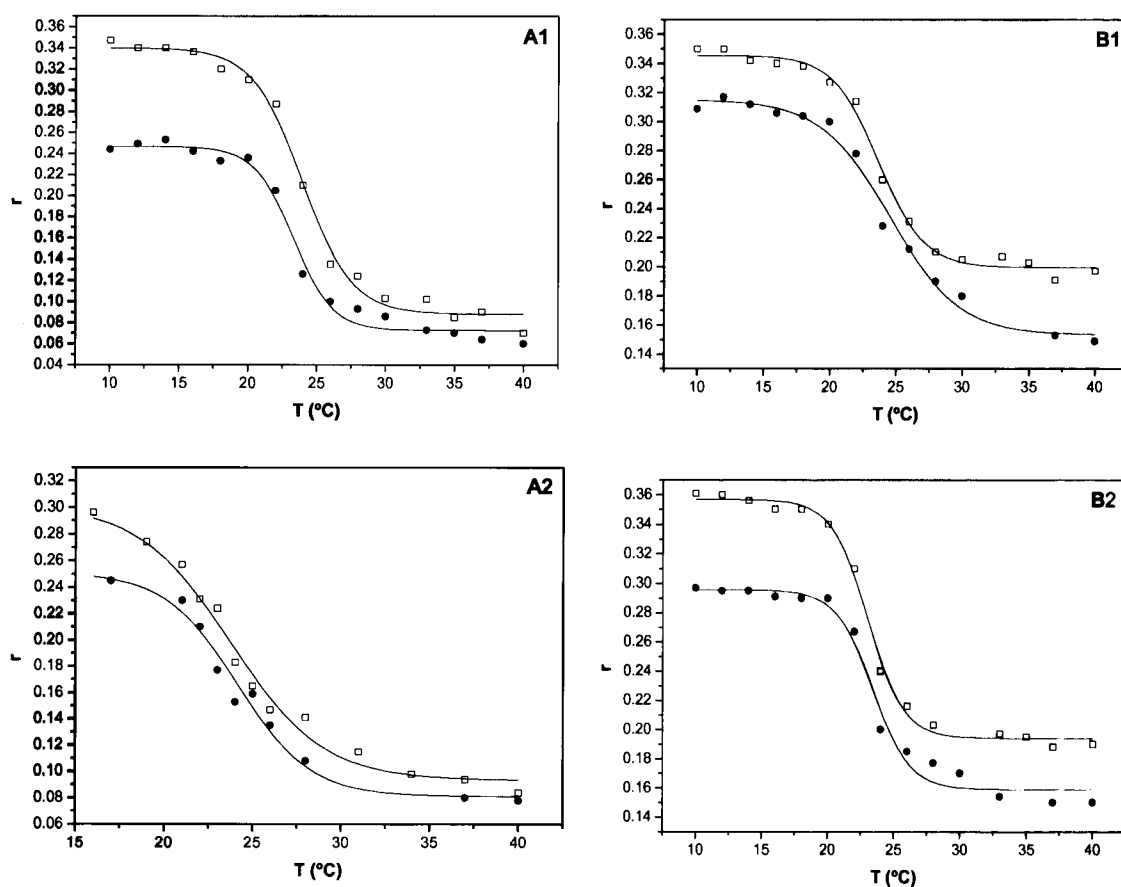


Figura III-13: Variação, com a temperatura, da anisotropia de fluorescência (r) das sondas DPH (A) e TMA-DPH (B), incorporadas em LUVs de DMPC (1) e DMPG (2), na ausência (□) e em presença (●) da moxifloxacina (18 μM). Cada um dos pontos corresponde ao valor médio de pelo menos três ensaios, distando dos valores obtidos em cada ensaio num máximo de 6 %.

Em presença da moxifloxacina a anisotropia das duas sondas, nos dois tipos de lipossomas estudados, apresenta um decréscimo em toda a extensão do intervalo de temperaturas explorado, porém, o referido decréscimo torna-se mais acentuado para o TMA-DPH em temperaturas acima da temperatura de transição. Adicionalmente, com o TMA-DPH foi notado um ligeiro aumento das temperaturas de transição de fase ($\sim 1^\circ\text{C}$), para ambos os lípidos, quando em presença do referido antibiótico (Tabela III-5).

	DPH				TMA-DPH			
	DMPC	DMPC-MX	DMPG	DMPG-MX	DMPC	DMPC-MX	DMPG	DMPG-MX
$T_m(^{\circ}\text{C})$	24,2	24,6	24,2	24,4	23,5	24,6	23,0	23,8
S	0,825	0,671	0,722	0,682	0,871	0,810	0,864	0,791

Tabela III-5: Temperaturas de transição de fase (T_m) e valores de parâmetro de ordem (S) para o DMPC e DMPG, na ausência e em presença da moxifloxacina (MX). O parâmetro de ordem foi calculado através da equação (6.4) ⁽¹⁴⁴⁾, à temperatura de 22°C , e a T_m foi obtida a partir do ponto de inflexão do modelo sigmoidal representado na Figura III-13.

A anisotropia de ambas as sondas usadas revelou um decréscimo quando em presença do fármaco, este facto traduz numa destabilização estrutural da membrana detectada em duas zonas distintas, sugerindo a presença da moxifloxacina não só na interface lipossoma/água mas também a um nível membranar mais interno susceptível de afectar o ambiente de inserção do DPH. Esta deslocalização do fármaco por ambientes membranares menos periféricos está em conformidade com o comportamento notado nos estudos de extinção de fluorescência com o iodeto, uma vez que, tal como se concluiu, da fracção de fármaco membranar o iodeto ainda acederia à zona da interface porém o decréscimo na constante de Stern-Volmer ficaria a dever-se a uma pequena parte totalmente inacessível.

A maior intensidade de efeito sentido com o TMA-DPH, em ambos os lípidos, confirma a prevalência de uma maior destabilização ao nível das cabeças polares dos fosfolípidos ^(146, 246), sendo a permeação do fármaco para zonas mais internas uma possível consequência desta destabilização inicial. A diminuição da ordem estrutural na interface membranar denotada pelo decréscimo de anisotropia do TMA-DPH foi acompanhada de um ligeiro aumento de T_m , o que sugere o estabelecimento de interações de índole electrostática entre as cabeças dos fosfolípidos e as moléculas de antibiótico ^(246, 247).

Paralelamente, também o decréscimo acentuado de anisotropia para o sistema DMPC-DPH em temperaturas abaixo da T_m , constitui confirmação da presença da moxifloxacina

na zona hidrofóbica da membrana, pois o acentuado empacotamento das cadeias hidrocarbonadas, característico da fase de gel, torna a acomodação de moléculas de fármaco a esse nível um factor altamente destabilizante, que consequentemente se traduz num forte decréscimo da anisotropia do DPH ⁽¹⁴⁶⁾. Porém, o mesmo efeito quando analisado acima da T_m não se faz sentir de forma tão acentuada pois o desarranjo estrutural que caracteriza esta fase facilmente acomoda moléculas de reduzidas dimensões sem que isso altere de forma mensurável o ambiente membranar em seu redor ⁽²⁴⁸⁾. Por motivos semelhantes, o referido decréscimo de anisotropia para o DPH abaixo de T_m , também não é tão acentuado quando a sonda está inserida em lipossomas de DMPG pois tratando-se de um lípido carregado o efeito de repulsão entre os fosfolípidos força a um maior afastamento entre as moléculas ⁽⁴³⁾, o que resulta numa maior capacidade para acomodar o fármaco.

1.2.2 Ressonância Paramagnética Electrónica (RPE)

Dos resultados descritos para a localização da moxifloxacina na bicamada fosfolipídica tornou-se evidente a presença deste fármaco a dois níveis membranares: na interface lipossoma/água e numa área de localização membranar mais interna cujas alterações afectam a anisotropia do DPH e que é inacessível ao ião iodeto. Porém, este tipo de informação carece ainda de maior detalhe topográfico uma vez que a localização do DPH torna esta molécula susceptível às alterações verificadas em grande parte da extensão das cadeias hidrocarbonadas que inclui zonas tão distintas como o início destas cadeias, imediatamente abaixo das cabeças polares dos fosfolípidos, e também a zona próxima ao centro hidrofóbico da bicamada ⁽¹⁴⁷⁾.

Com o objectivo de melhor se esclarecer a localização membranar deste fármaco recorreu-se a estudos de espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica (realizados à temperatura constante de 37 °C), intercalando nas bicamadas dos lipossomas sondas de ácido esteárico marcadas com radicais nitróxido ao nível do carbono 5 e 16 (Figura I-23). Uma vez que estas sondas estão orientadas na bicamada da mesma forma que os lípidos que a constituem ⁽¹⁴⁹⁾, a presença do radical nitróxido na posição 5 ou 16 da cadeia carbonada permite aceder a informação das duas principais regiões da bicamada, a zona das cabeças polares dos fosfolípidos e início das cadeias carbonadas de C_1 - C_5 (5-DS) e a zona terminal das cadeias hidrocarbonadas (16-DS).

As proporções sonda/fosfolípido usadas nestes estudos foram sempre da ordem dos 1%, isto como forma de evitar alterações membranares⁽⁴³⁾ e fenómenos de interacção entre moléculas de sonda em situação de proximidade⁽¹⁴⁸⁾.

O espectro de RPE obtido para a sonda 16-DS incorporada numa bicamada lipídica, em fase fluida, reflecte o movimento isotrópico da cadeia hidrofóbica sendo assim caracterizado por um traçado típico (Figura III-14A) de três linhas relativamente próximas ($2A_{\text{máx}} \sim 38$ G), cuja razão entre as alturas dos picos constitui indicação da mobilidade da sonda. O parâmetro frequentemente usado para avaliar o movimento das cadeias hidrocarbonadas dos fosfolípidos na sua zona terminal é o tempo de correlação rotacional (t), cujo cálculo é realizado medindo a altura e largura de banda do espectro obtido (8.1, Capítulo I- item 4.2.4).

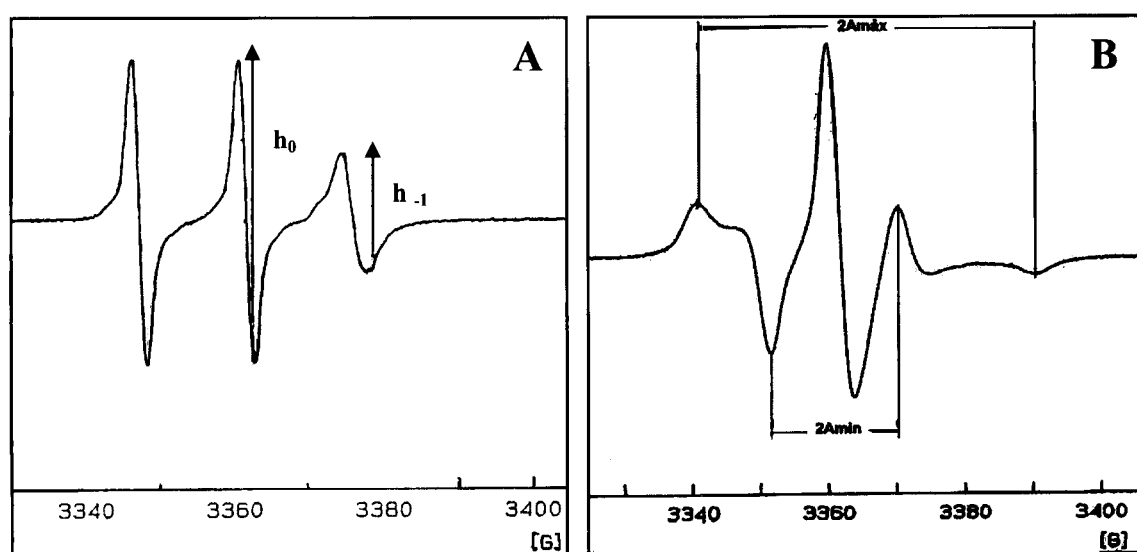


Figura III-14: Espectros de RPE das sondas de 16-DS (A) e 5-DS (B), incorporadas em LUVs de DMPC. Espectros traçados à temperatura constante de 37 °C.

Em relação à sonda 5-DS incorporada em bicamada lipídica em fase fluida, o seu espectro de RPE abrange uma zona maior do campo magnético, apresentando desdobramentos hiperfinos máximos ($2A_{\text{máx}}$) de ~ 50 G, mesmo a temperaturas superiores a T_m (Figura III-14B). O espectro observado reflecte o movimento anisotrópico da sonda e, portanto a fluidez membranaar pode ser estimada a partir de $2A_{\text{máx}}$, valor que irá reflectir a liberdade rotacional dos fosfolípidos na zona próxima das cabeças polares⁽²⁴⁹⁾. A determinação de tempos de correlação rotacional, por leitura directa, em espectros deste tipo tornar-se bastante complicada uma vez que estaria sempre associada a elevados índices de imprecisão. Assim, o parâmetro de maior relevância neste tipo de situação é o

parâmetro de ordem (S), que vai traduzir a amplitude de flutuação angular. Este parâmetro operacional pode ser facilmente obtido por leitura directa do espectro, recorrendo aos valores de desdobramento hiperfino máximo, $2A_{\text{máx}}$, e mínimo, $2A_{\text{min}}$ (Figura III-14B), de acordo com a expressão (8.2, Capítulo I- item 4.2.4).

Quer o parâmetro de ordem, quer o tempo de correlação rotacional estão inversamente relacionados com a fluidez ⁽²⁴⁹⁾, portanto, um decréscimo em qualquer um destes parâmetros é vulgarmente relacionado com um aumento de fluidez.

Os espectros de RPE obtidos para a sonda 16-DS em presença e na ausência da moxifloxacina apresentam-se com a mesma forma e originam tempos de correlação rotacional idênticos, a menos de erro experimental, em ambos os tipos de lipossomas (Tabela III-6).

DMPC		DMPG	
t (nsec)		t (nsec)	
0 μM MX	0,154	0 μM MX	0,157
31 μM MX	0,155	31 μM MX	0,157

Tabela III-6: Valores de tempos de correlação (t) para a sonda 16-DS, incorporada em LUVs de DMPC e DMPG.

Em relação à sonda 5-DS, os espectros de RPE obtidos para esta sonda incorporada em LUVs de DMPC ou DMPG revelam-se diferentes (Figura III-15), consequência principalmente da estrutura aniónica do grupo hidrofílico do DMPG em relação ao carácter de ião dipolar do DMPC. A principal diferença detectada ocorre nos picos espectrais a campo magnético mais baixo, observando-se espectros menos anisotrópicos para o DMPG, fenómeno atribuído à diferença estrutural intrínseca da bicamada de DMPG em que, consequência das repulsões electrostáticas entre as cabeças polares, se obtém uma disposição fosfolipídica muito menos compacta ^(43, 250). Esta diferença é ainda corroborada pelos valores de $2A_{\text{máx}}$ obtidos (Tabela III-7), os quais se revelam inferiores para o DMPG, o que constitui evidência de uma bicamada mais fluida.

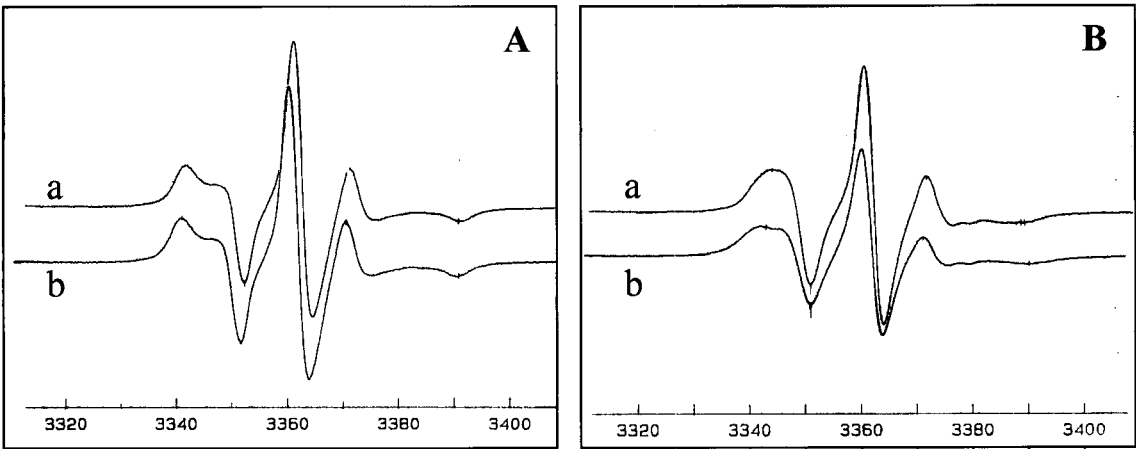


Figura III-15: Espectros de RPE, traçados à temperatura constante de 37 °C, da sonda 5-DS (39,8 µM) incorporada em LUVs de DMPC (A) ou DMPG (B), na ausência (a) e em presença (b) de 31 µM de moxifloxacina.

Quando em presença da moxifloxacina os espectros de RPE da sonda 5-DS (Figuras III-15B) denunciam um aumento de anisotropia, corroborado por um acréscimo nos valores de $2A_{\text{máx}}$, sendo esta variação de maior intensidade no caso do DMPG (Tabela III-7).

DMPC			DMPG		
	$2A_{\text{máx}}$ (G)	S		$2A_{\text{máx}}$ (G)	S
0 µM MX	49,0	0,131	0 µM MX	45,0	0,107
31 µM MX	50,4	0,139	31 µM MX	47,7	0,122

Tabela III-7: Valores do parâmetro de ordem (S) e desdobramento hiperfino máximo ($2A_{\text{máx}}$) para a sonda 5-DS incorporada em LUVs de DMPC e DMPG, na ausência e em presença da moxifloxacina.

Da análise da tabela acima, torna-se evidente a reduzida amplitude dos efeitos sentidos, facto que poderia levantar algumas dúvidas quanto à relevância destes resultados. Contudo, este tipo de estudo envolvendo sondas como as que foram utilizadas, sofre de algumas limitações inerentes às dimensões e rigidez da estrutura que suporta o radical nitróxido (anel oxazolinico), ou seja, este tipo de sonda requer algumas considerações no que respeita à análise dos resultados quando estas são empregues para reportar a presença de moléculas de tamanho relativamente pequeno, como acontece com a MX. A movimentação da cadeia carbonada contendo um grupo volumoso como o anel oxazolinico, não é susceptível de reproduzir de forma exacta a movimentação das restantes

cadeias carbonadas ⁽¹⁴⁸⁾, logo as variações impostas pela presença do fármaco são reflectidas na movimentação da sonda mas com uma certa dose de atenuação.

Os resultados obtidos dão indicação de que apenas a sonda 5-DS é afectada pela presença da moxifloxacina e que este efeito é mais pronunciado em lipossomas de DMPG. Assim sendo, os resultados de RPE confirmam a previsão de uma interacção da moxifloxacina com os lipossomas de índole predominantemente electrostático, com uma localização membranar do fármaco essencialmente periférica mas que se poderá estender ao início da cadeia carbonada, pelo menos até ao nível do carbono 5, tal como se fazia antever pelos resultados de anisotropia e extinção de fluorescência.

Salienta-se ainda, que no caso das sondas de RPE, o efeito espectral final traduz uma média da totalidade dos efeitos sentida, incluindo-se nesses efeitos não só as alterações estruturais, mas também efeitos de alteração de polaridade ⁽¹⁴⁸⁾, eventualmente causados pela presença do próprio fármaco ou de moléculas de água decorrentes da alteração imposta pela presença deste. Assim, e de acordo com o tipo de informação pretendida com estes estudos, os resultados de RPE devem ser interpretados do ponto de vista qualitativo e sempre numa perspectiva comparativa. A aplicação de técnicas de RPE com recurso a sondas de localização a diferentes níveis membranares permite obter informação sobre as alterações membranares a esses níveis e, assim, através de estudos comparativos facultar informação de possíveis interacções fármaco/membrana.

1.3 Conclusões

A interacção da moxifloxacina com lipossomas de diferente composição lipídica revelou-se de maior intensidade do que a verificada para outras quinolonas das primeiras gerações, provavelmente em resultado das suas distintas propriedades ácido/base e do incremento de hidrofobicidade na sua estrutura. A introdução do grupo metoxi e do anel diazobiclonilo, respectivamente nas posições 8 e 7 da estrutura desta fluoroquinolona, alteram as características físico-químicas da MX, intensificando a sua interacção com os lipossomas e consequentemente denunciando que a potenciação de uma possível primeira fase de interacção membranar poderá ser a explicação para o alargamento do seu espectro antibacteriano não só no que respeita a estirpes do tipo Gram (+) como também a estirpes bacterianas ultraestruturalmente distintas.

Os resultados obtidos para a partição da MX nos lipossomas são corroborados pelos estudos de localização membranar do fármaco e sugerem a presença desta quinolona principalmente em zonas periféricas perto das cabeças polares dos fosfolípidos, com

interacções de maior intensidade no caso de lípidos carregados negativamente, apontando para a prevalência, pelo menos inicial, de uma interacção electrostática. Paralelamente, a comparação dos resultados de anisotropia obtidos para a MX, com aqueles descritos, por exemplo, para a GP (fluoroquinolona de 3^a geração), apontam para uma permeação membranar da MX para zonas ligeiramente mais hidrofóbicas, já que a sua presença afectou a anisotropia do TMA-DPH mas também do DPH, em ambos os lípidos e mesmo para temperaturas acima da T_m , o que não foi notado para outras quinolonas ^(11, 140, 247). Os resultados de RPE são concordantes com os estudos de localização por técnicas de fluorescência, corroborando a localização essencialmente periférica deste fármaco mas melhorando a definição topográfica da extensão da sua permeação para áreas de maior hidrofobicidade, e limitando a sua presença numa área que se estende desde a interface membranar até ao início das cadeias carbonadas ao nível do carbono 5. Portanto, a conjugação dos resultados de localização por fluorescência e por RPE evidencia a existência de um reforço da componente hidrofóbica na transposição membranar da moxifloxacina, característica pouco evidente para outras fluoroquinolonas, e que se associa à presença do grupo metoxi na posição 8 da estrutura desta fluoroquinolona.

Paralelamente, a observação de espectros de RPE menos anisotrópicos para a sonda 5-DS incorporada em lipossomas de DMPG, dá indicação de uma organização estrutural menos compacta, o que permite uma melhor compreensão do acréscimo da partição deste fármaco nos LUVs de DMPG, pois em adição à componente electrostática, este tipo de lípido apresenta ainda uma organização estrutural favorável à incorporação do fármaco.

Face a estes resultados o mecanismo pelo qual a MX interage com as bicamadas fosfolipídicas passa forçosamente por uma etapa inicial de adsorção electrostática à interface membranar fase essencial para o desenrolar das fases seguintes mas que por si só não explica a totalidade dos efeitos membranares deste fármaco. Após esta fase inicial, e atendendo à tendência das fluoroquinolonas para agregarem em ambientes lipídicos, pode assumir-se um segundo passo de destabilização desta região periférica com formação de microdomínios e acumulação na região da interface e, consequentemente, formação de um gradiente de concentrações de fármaco através da membrana por difusão passiva, que explica a presença deste antibiótico até à zona inicial das cadeias hidrocarbonadas ^(140, 244).

Os estudos desenvolvidos reforçam o conceito de que pequenas diferenças na estrutura química de uma substância activa podem originar grandes alterações nas suas propriedades físico-químicas e consequentemente na sua actividade farmacológica, assim, o esclarecimento do tipo de interacção estabelecida entre o fármaco e as diferentes

biomembranas poderá evidenciar as características estruturais do fármaco com maior relevância para o seu desempenho terapêutico. No caso da MX as alterações estruturais introduzidas, para além de incrementarem a componente hidrofóbica, provocaram também uma alteração na sua acidez, daqui resultando um aumento da concentração das espécies dipolar e catiónica a pH fisiológico e consequentemente, um aumento dos coeficientes de partição desta fluoroquinolona em superfícies membranares carregadas negativamente o que poderá estar associado à sua relativamente elevada actividade antibacteriana em estirpes de Gram (+). Quando se compara os resultados obtidos para a MX com aqueles descritos para a GP ⁽¹¹⁾, notam-se algumas similaridades quer nas suas características físico-químicas quer no que respeita ao incremento da sua actividade contra Gram (+), daqui facilmente se deduz uma forte relação entre a potenciação das interacções membranares do tipo electrostático e o alargamento da actividade antibacteriana a bactérias do tipo Gram (+) cuja superfície membranar se apresenta carregada negativamente a pH fisiológico. Adicionalmente, o incremento da componente hidrofóbica, evidenciado pelos estudos de fluorescência e de RPE, e apenas notado em presença da MX, parece associar-se não só com o alargamento do seu espectro de acção, mas também com uma provável melhoria da sua actividade antibacteriana demonstrada por uma maior eficiência com doses terapêuticas inferiores ^(229, 230, 251, 252), ou seja, esta capacidade não específica de permear os diferentes invólucros bacterianos poderá estar na origem do seu largo espectro de actividade antibacteriana e assim da sua distinção em relação a outras quinolonas de gerações anteriores.

2. Reconstituição de OmpF em vesículas lipossômicas de DMPC

A entrada das quinolonas na célula bacteriana de Gram (-) está fortemente condicionada pela capacidade destes antibióticos em transpor as barreiras membranares bacterianas. A permeação na membrana externa, a primeira dessas barreiras, tem sido fortemente associada à presença da porina OmpF, assim, o estudo das vias de entrada das quinolonas nas bactérias passa, necessariamente, pela averiguação do tipo de interação estabelecido entre esta proteína e os diferentes membros deste grupo de fármacos.

O estudo de proteínas membranares no seu ambiente nativo apresenta grandes dificuldades de interpretação consequência da sua complexidade intrínseca e das inúmeras interferências dos restantes constituintes membranares. A reconstituição de proteínas membranares em lipossomas (proteolipossomas) constitui uma solução eficaz de obviar esta questão, e tem-se demonstrado uma ferramenta valiosa para a identificação e esclarecimento do mecanismo molecular de funcionamento destas proteínas e da sua interação com os mais diversos substratos.

Assim, pela necessidade de se aproximar o modelo membranar em utilização da realidade a mimetizar, procedeu-se à reconstituição de OmpF em lipossomas de DMPC, tendo-se experimentado duas principais linhas metodológicas de reconstituição:

- Reconstituição por diluição de mistura micelar (co-micelização da proteína em mistura de lípido-detergente);
- Reconstituição por incorporação em lipossomas pré-preparados (diluição de mistura detergente-proteína em suspensão lipossômica).

Os procedimentos desenvolvidos tiveram como principal objectivo a obtenção de um procedimento reprodutível, fiável e capaz de originar estruturas em que a proteína se mantenha activa e conserve a sua organização estrutural nativa de forma a cumprir as necessidades dos estudos a desenvolver.

A escolha do detergente a utilizar é muitas vezes determinante em relação aos resultados finais obtidos, sendo também fortemente condicionada pela capacidade do detergente em solubilizar e manter em conformação estável e activa a proteína que se pretende reconstituir ⁽⁸⁴⁾. No caso específico da porina OmpF, esta proteína apresenta elevada estabilidade funcional e conformacional quando conservada em solução micelar de oPOE, assim, este foi também o detergente usado nos procedimentos de reconstituição. Relativamente à componente lipídica escolhida, a utilização do DMPC é justificada pela

sua intrínseca compatibilidade estrutural com a zona hidrofóbica da proteína, já que apresenta uma cadeia hidrocarbonada saturada e com o mesmo número de carbonos que as cadeias hidrocarbonadas predominantes do LPS presente no folheto externo da OM^(20, 253). Paralelamente, trata-se de uma componente lipídica cuja interação com a maioria das quinolonas em estudo é já perfeitamente conhecida^(11, 140), consequentemente, a sua contribuição para a permeação membranar destes fármacos e para uma possível influência na sua interação com OmpF é, assim, de mais fácil avaliação.

2.1 Estudos preliminares: efeito do oPOE sobre os LUVs de DMPC

De forma a permitir uma monitorização dos mecanismos de inserção proteica durante os procedimentos de reconstituição mediados por detergente, desenvolveu-se uma estratégia experimental de estudo da influência do oPOE sobre os lipossomas de DMPC. A base teórica deste procedimento assenta na ideia de que o processo de reconstituição por remoção do detergente constitui o inverso do processo de solubilização por aumento da quantidade de detergente^(73, 81, 83, 207). Como tal, adicionaram-se quantidades crescentes de detergente a uma concentração constante de lipossomas pré-preparados, de forma a abranger todo o intervalo de concentrações de detergente que vai desde a destabilização da bicamada fosfolipídica até à transformação dos lipossomas em micelas mistas. Os sucessivos acontecimentos decorrentes da adição/remoção de detergente de uma mistura de reconstituição têm sido investigados através de uma grande variedade de técnicas experimentais desde a turbidimetria^(207, 254), à transferência de energia de fluorescência^(255, 256), à espectroscopia de correlação fotónica^(257, 258), à microscopia electrónica^(259, 260), entre outras. No estudo do efeito do oPOE sobre os LUVs de DMPC recorreu-se à avaliação da turbidez, por acompanhamento das variações da dispersão de Rayleigh, e à determinação da granulometria das amostras por espectroscopia de correlação fotónica.

2.1.1 Variações da dispersão de Rayleigh

A turbidez de uma suspensão lipossómica sofre um decréscimo acentuado na transição do estado vesicular para o estado micelar (Figura III-16), esta alteração foi utilizada para se acompanhar as alterações decorrentes do aumento da concentração de oPOE no sistema vesicular em estudo. A interação das moléculas de detergente com modelos membranares tem sido interpretada de acordo com um modelo em três etapas, cuja extensão e propriedades de cada etapa é característica dos componentes do sistema em estudo, isto é, constituintes lipídicos das vesículas e detergente^(73, 83, 207). Para a mistura de reconstituição

utilizada, vesículas de DMPC sob ação do detergente oPOE, as alterações à turbidez da mistura, nas várias fases de solubilização membranar, encontram-se sumariadas graficamente na Figura III-16.

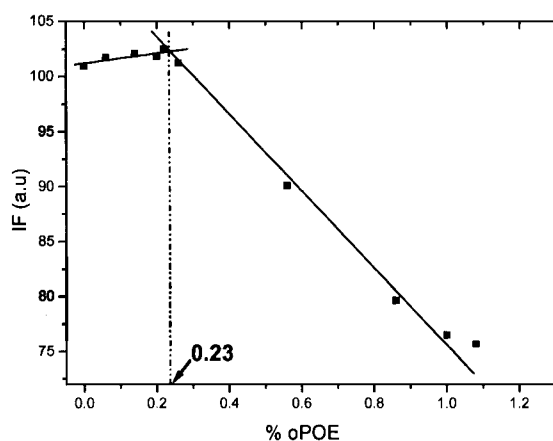


Figura III-16: Alterações à turbidez das suspensões lipossômicas (1,5 mM DMPC) em presença de concentrações crescentes de oPOE (0-1,1 %), acompanhadas por avaliação da dispersão de luz ao comprimento de onda de excitação e emissão de 450 nm.

A primeira fase da adição do detergente aos lipossomas pré-preparados, envolve a partição das moléculas de detergente nas bicamadas fosfolipídicas fenómeno que se prolonga até se atingir a saturação membranar^(73, 83, 207). Durante esta fase, a incorporação do oPOE nas bicamadas fosfolipídicas dos LUVs de DMPC causa um aumento da turbidez da amostra, tendência que se manifesta a partir de concentrações de oPOE de ~ 0,10 % e que persiste até cerca de 0,23 % (valor da CMC do oPOE). Assim, apesar de a solubilização membranar não ocorrer nesta fase, a presença do detergente induz perturbações estruturais, como têm sido evidenciadas através das referências a aumentos de permeabilidade membranar^(95, 207, 255) ou por alterações do tamanho das vesículas.

A segunda etapa é caracterizada por uma gradual solubilização das vesículas lipossômicas que resulta numa coexistência de micelas mistas de lípido-detergente e vesículas lipossômicas saturadas em detergente^(83, 207). Durante toda esta fase de transição estrutural de vesículas para micelas existe esta dualidade de estruturas, verificando-se apenas um aumento na proporção relativa de micelas em relação às vesículas, característica facilmente dedutível da acentuada diminuição de turbidez (Figura III-16), à medida que aumenta a quantidade de detergente. No sistema de reconstituição em estudo esta etapa fica compreendida entre as concentrações de oPOE de 0,23 a ~1 %. Na fase final deste procedimento os fosfolípidos são completamente solubilizados a micelas mistas, originando amostras transparentes.

2.1.2 Granulometria das estruturas nas diferentes fases de solubilização das vesículas lipossômicas

As alterações à dispersão da amostra podem também decorrer de outros factores inerentes à técnica que não a transição de vesícula a micela e daí a necessidade de recorrer a uma segunda técnica experimental como forma de comprovar a realidade estrutural das alterações deduzidas ⁽⁸³⁾. No estudo realizado o segundo parâmetro avaliado foi a homogeneidade de tamanhos das estruturas que para além de confirmar e justificar as alterações de turbidez das amostras, permitiu ainda esclarecer, em relação à primeira etapa do processo, o tipo de alterações estruturais em causa.

Na Figura III-17 apresentam-se os histogramas representativos da distribuição de tamanhos das estruturas para as amostras com diferentes concentrações de oPOE, e na Tabela III-8 faz-se um resumo destes mesmos resultados apresentando-se os valores médios para os tamanhos das estruturas nas diferentes fases de solubilização vesicular.

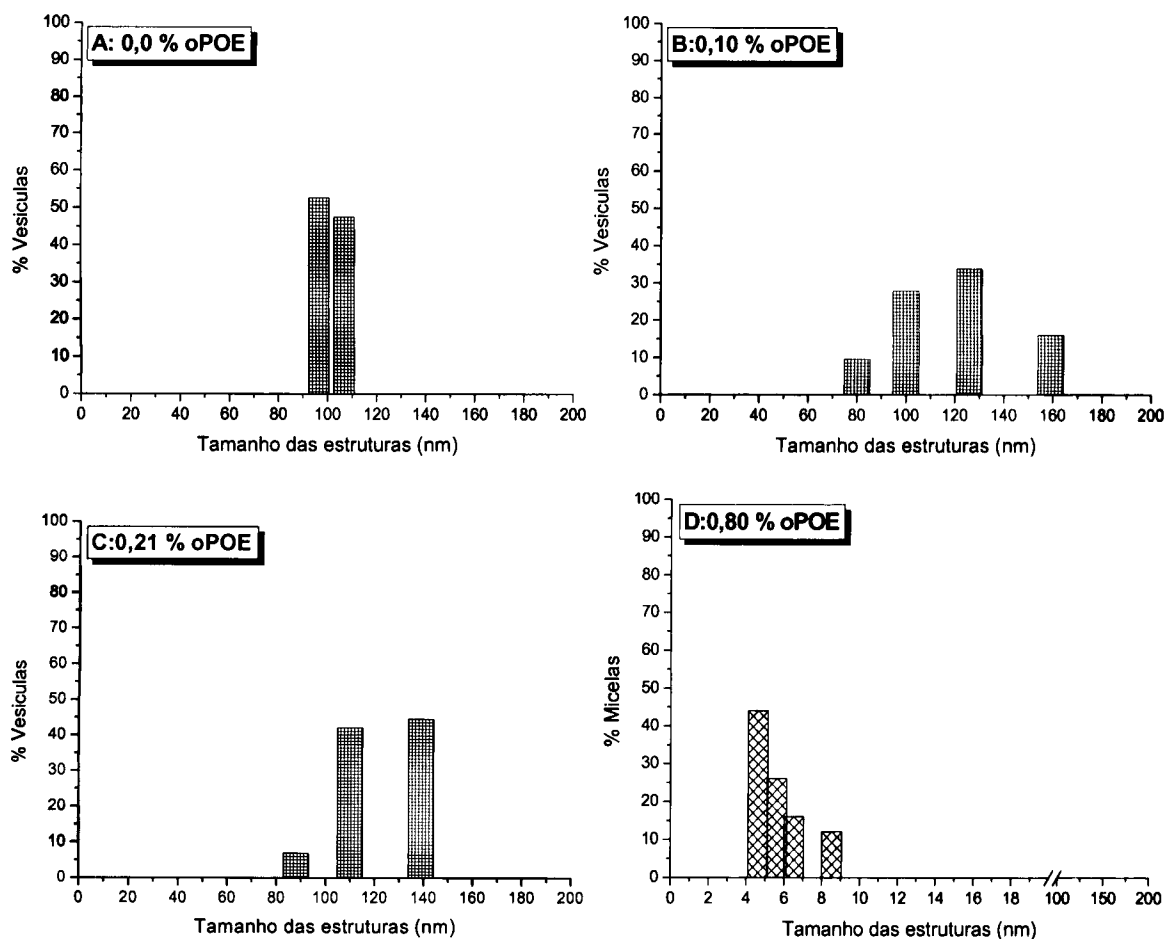


Figura III-17: Histogramas representativos da distribuição de tamanhos das estruturas (Vesículas em A, B e C; Micelas em D) presentes nas amostras com diferentes concentrações de oPOE. Lipossomas preparados pela metodologia descrita no item 3. (Capítulo II). Concentração de DMPC constante em todas as amostras e igual a 1,5 mM. As diferentes concentrações de oPOE encontram-se descritas no histograma correspondente.

As barras dos histogramas A, B e C apresentam-se com uma largura de 10 nm, e em D a largura da barra é de 1 nm.

% oPOE	0,00	0,10	0,18	0,20	0,80
Tamanho médio das estruturas (nm)	101	119	121	126	7
Índice de polidispersão	0,08	0,25	0,10	0,10	0,20

Tabela III-8: Valores médios de tamanho das estruturas presentes nas suspensões, e respectivos índices de polidispersão, para diferentes concentrações de oPOE.

A análise dos resultados acima expostos evidencia uma fase inicial em que se nota um ligeiro aumento do tamanho das vesículas, seguida de um marcado decréscimo do tamanho destas estruturas. Deste resultado facilmente se estabelece um paralelismo com as variações à dispersão de Rayleigh, justificando-se o aumento inicial da dispersão por aumento do tamanho das vesículas e o acentuado decréscimo com a passagem à fase micelar, o que se confirma pelo reduzido tamanho das estruturas. Um aumento da dispersão de luz constitui, normalmente, indicação de um aumento do tamanho das estruturas em suspensão o que pode resultar de um processo de fusão vesicular coadjuvado pela presença de detergente e frequente em vesículas obtidas por processos de sonicação^(83, 207), ou de uma simples desorganização estrutural das bicamadas com consequente aumento da permeabilidade da vesícula. Assim, a detecção de estruturas de dimensões não muito distintas das iniciais e a maior homogeneidade na distribuição desses tamanhos (Figura III-17), constitui indicação de que o aumento de tamanho das estruturas está muito provavelmente associado a uma simples desorganização estrutural das vesículas⁽²⁰⁷⁾, ficando, assim, melhor esclarecido o inicial aumento do tamanho das vesículas por adição de oPOE como um fenómeno decorrente de uma desorganização estrutural e não de fusão vesicular.

Uma conclusão importante deste conjunto de procedimentos reside na fácil visualização e análise das diferentes fases de solubilização através das alterações à turbidez da amostra⁽⁸³⁾. Quando se analisa um traçado gráfico como o representado na Figura III-16, a etapa inicial de destabilização membranar é associada a um efeito ligeiro sobre a turbidez da amostra, fortemente contrastante com o decréscimo acentuado da segunda etapa, correspondente à solubilização gradual das vesículas que culmina na etapa final com a solubilização de todas as vesículas e a transformação da amostra numa solução

ópticamente transparente. Assim, com este tipo de acompanhamento das alterações estruturais da mistura de reconstituição, a tarefa de selecção das proporções lípido-detergente ou da fase adequada à adição da proteína membranar, é reduzida a uma análise atenta do traçado gráfico e à compatibilidade da fase seleccionada com o procedimento de reconstituição a aplicar. Nos procedimentos de reconstituição experimentados, para a incorporação da proteína em lipossomas pré-preparados a quantidade de detergente na mistura de reconstituição nunca ultrapassou os 0,11 %, enquanto que na metodologia que envolve uma fase de micelas mistas a concentração de oPOE nesta fase é de 0,8 %.

2.2 Caracterização dos proteolipossomas obtidos pelas diferentes metodologias experimentadas

Existe uma grande variedade de métodos para inserir proteínas membranares em lipossomas, que vão desde a reconstituição mediada por detergentes, às vias mecânicas ou a reconstituições mediadas por solvente orgânico. De entre estes, a reconstituição mediada por detergente é, normalmente, bem sucedida e conveniente pois o detergente é quase sempre usado na fase inicial da purificação da proteína ⁽⁷³⁾. Neste tipo de procedimento de reconstituição, existem duas principais abordagens que constituíram a base das metodologias experimentadas neste trabalho, a primeira consiste numa simples diluição, tendo por base o princípio de que se uma mistura micelar de proteína-detergente for diluída numa suspensão lipossómica de tal forma que a concentração de detergente fique abaixo da sua CMC as micelas de detergente tornam-se instáveis e a proteína é transferida para os lipossomas. Relativamente à segunda abordagem, esta envolve a co-micelinização da proteína em detergente e lípido com a concentração do detergente acima da sua CMC, com posterior diluição de toda a mistura até que o detergente atinja concentrações abaixo da sua CMC. Destas duas abordagens bastante distintas resultaram populações de proteolipossomas de características estruturais e distribuição de tamanhos diferentes.

2.2.1 Granulometria dos Proteolipossomas

A análise de granulometria das populações de proteolipossomas obtidas pelos procedimentos de reconstituição teve como objectivo principal a caracterização das diferentes populações de forma a permitir o planeamento de uma estratégia de padronização de tamanhos.

A distribuição de tamanhos dos proteolipossomas obtidos foi determinada por espectroscopia de correlação fotónica que paralelamente à análise detalhada do perfil de

tamanhos permite ainda fazer uma avaliação quanto à polidispersão da população obtida. Os resultados obtidos por cada uma das metodologias experimentadas encontram-se sumariados nos histogramas representados na Figura III-18.

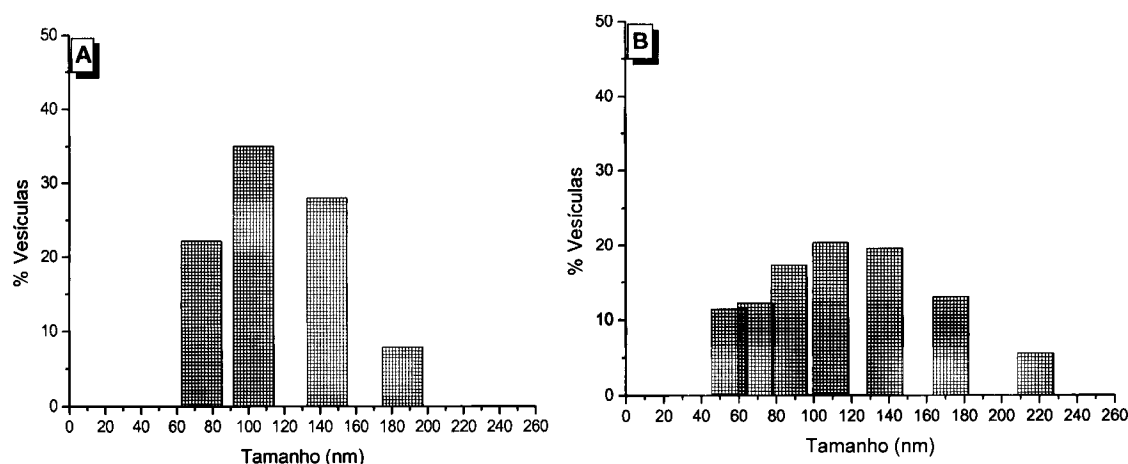


Figura III-18: Histogramas representativos da distribuição de tamanhos dos proteolipossomas obtidos por diferentes procedimentos de reconstituição: (A) inserção proteica em lipossomas pré-preparados; (B) proteolipossomas reconstituídos por diluição de mistura micelar de proteína-detergente-lípido. As barras dos histogramas A e B apresentam-se com uma largura de 20 nm. A polidispersão da amostra A e B é de 0,17 e 0,21 respectivamente.

Relativamente à homogeneidade na distribuição de tamanhos das estruturas obtidas, os proteolipossomas obtidos por inserção proteica em lipossomas pré-preparados apresentam-se mais homogêneos que aqueles obtidos por diluição de mistura micelar. Outra diferença relevante deste procedimento relativamente ao de inserção em lipossomas pré-preparados, relaciona-se com a existência de elevada percentagem de proteolipossomas com tamanhos a rondar os 50 nm na mistura final. Esta predominância de estruturas de menores dimensões acarreta dois principais inconvenientes, o primeiro relaciona-se com uma menor estabilidade estrutural deste tipo de vesícula e, consequentemente, com a sua maior tendência para a fusão com vesículas vizinhas^(84, 207). Paralelamente, as elações tiradas, nos estudos prévios de partição e localização membranar, em relação à componente lipídica, teriam a sua aplicabilidade comprometida em todos os estudos que utilizassem este tipo de proteolipossomas como modelo membranar, pois a padronização de tamanhos para valores próximos dos anteriormente utilizados (100 nm) estaria obviamente dificultada.

2.2.2 Confirmação da estabilidade da estrutura quaternária nativa de OmpF: SDS-PAGE

Na sua conformação nativa OmpF apresenta-se sob a forma de trímero, com posição electroforética (SDS-PAGE) a 97 kDa (Figura III-19A, B, C e E). Esta proteína membranar é dotada de elevada estabilidade conformacional, só se notando a sua desnaturação perante elevadas concentrações de agentes desnaturantes e/ou por aquecimento a 100 °C, em tais circunstâncias apresenta-se sob a forma de monómero com uma resolução electroforética na proximidade dos 37 kDa (Figura III-19D), o que se encontra em conformidade com o descrito na literatura^(261, 262).

Em todos os estudos envolvendo a presença de OmpF, a proteína foi utilizada na forma conformacional que dispõe quando inserida nas membranas de origem. A conservação da sua estrutura quaternária nativa foi verificada, por electroforese em SDS-PAGE, sempre que se procedeu à sua reconstituição ou inserção em diferentes estruturas. Na Figura III-19 encontra-se representado um gel de electroforese contendo aplicações de amostras de OmpF inserida em diferentes tipos de estruturas (micelas e em lipossomas).

A localização das bandas electroforéticas resultantes de amostras contendo OmpF encontra-se de acordo com o descrito na literatura. Relativamente à presença, com disposição sequencial, de mais de uma banda por amostra, esta tem sido descrita^(261, 263) como resultante da contaminação da amostra com quantidades vestígias de LPS decorrentes do processo de purificação e cuja presença diminui a mobilidade electroforética das fracções de proteicas.

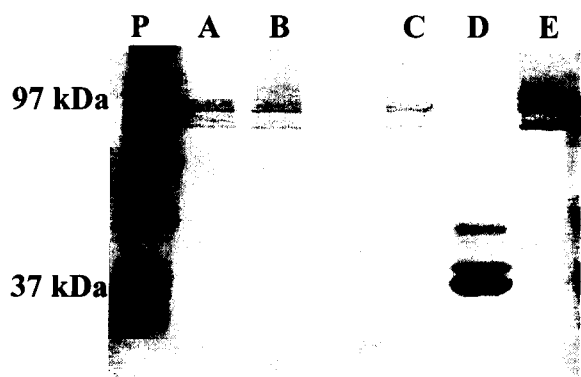


Figura III-19: Electroforese de amostras contendo OmpF. Em P foi aplicada solução de padrões proteicos evidenciando-se as zonas de peso molecular com relevância para as diferentes conformações de OmpF apresentadas. Em A e B foram aplicadas as misturas de reconstituição (1,5 µg) por inserção em lipossomas pré-preparados e por diluição da mistura micelar, respectivamente. Em C aplicou-se amostra de micelas mistas de oPOE/DMPC contendo OmpF (1,3 µg). Em D e E aplicou-se solução mãe de OmpF (5,8 µg) em 3 % de oPOE, sujeita a desnaturação por aquecimento a 100 °C, 5 min, em tampão desnaturante (D) e na sua conformação nativa (E).

2.2.3 Conclusões

Vesículas lipossômicas contendo proteínas inseridas na sua bicamada, normalmente designados de proteolipossomas, constituem excelentes modelos para o estudo estrutural e funcional de proteínas membranares. Porém, para constituírem sistemas modelo com validade para a realização de estudos funcionais, têm de cumprir alguns requisitos básicos. A homogeneidade na distribuição de tamanhos das vesículas, facilmente conseguida através da extrusão, constitui, normalmente, um requisito essencial. Um outro parâmetro a ter-se em conta é a homogeneidade na distribuição da proteína pela população de vesículas e a estabilidade estrutural e funcional destas proteínas. Por último, se o objectivo da reconstituição da proteína é a realização de estudos de transporte ou permeação através de canais proteicos, então a orientação da inserção transmembranar também constitui factor condicionante, pois torna-se necessário assegurar e conhecer a localização e/ou sentido de passagem ou interacção da substância em estudo.

Os procedimentos de reconstituição experimentados apresentam comportamentos distintos quanto ao cumprimento de cada um dos requisitos acima mencionados, tendo-se efectuado a selecção do procedimento a utilizar de acordo com os parâmetros mais importantes para os estudos subjacentes a efectuar com estas estruturas. Assim, dado que a reconstituição de OmpF tinha como objectivo final a avaliação da importância desta proteína na entrada das quinolonas em bactérias de Gram (-), a unidireccionalidade de inserção proteica e a homogeneidade na distribuição de tamanhos constituíram requisitos essenciais. Relativamente às percentagens de inserção proteica nas bicamadas fosfolipídicas das vesículas, salienta-se que em ambas as metodologias se obtiveram valores na ordem dos 80-90 %, pelo que este não constituiu factor decisivo para a escolha do procedimento de reconstituição a adoptar.

O procedimento de reconstituição por diluição a partir de uma fase inicial de mistura micelar de detergente, proteína e lípido, tem a vantagem de constituir um procedimento de execução bastante rápida, porém, verifica-se que a grande percentagem das partículas apresenta dimensões bastante abaixo dos 100 nm o que constitui um problema no que respeita à padronização dos tamanhos das vesículas para as dimensões dos lipossomas utilizados nos estudos de partição (100 nm) de forma a melhor discernir a contribuição da componente lipídica. No que respeita à unidireccionalidade de inserção, dado o carácter aleatório de incorporação membranar da proteína neste tipo de procedimento, os proteolipossomas obtidos têm normalmente uma disposição proteica aproximadamente assimétrica, isto é, parte das proteínas apresentam-se com a mesma orientação que

apresentam nas membranas nativas e a restante fracção com a orientação oposta à que dispõem na membrana nativa⁽⁸⁴⁾ (Figura III-20 A).

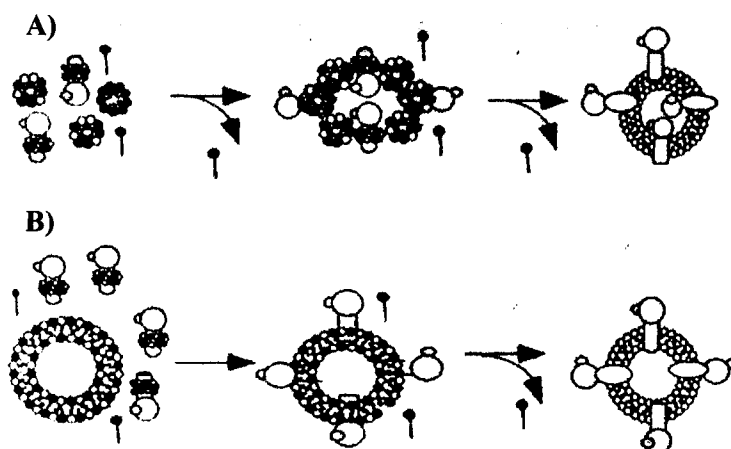


Figura III-20: Representação

esquemática dos procedimentos de reconstituição membranar de OmpF experimentados, destacando-se a orientação final de inserção: A) reconstituição a partir de mistura micelar; B) Reconstituição por inserção em lipossomas pré-preparados. Adaptado da referência [81].

Relativamente à reconstituição por inserção em lipossomas pré-preparados, salienta-se a maior homogeneidade no que respeita à distribuição de tamanhos das partículas obtidas. Adicionalmente, a maior percentagem de vesículas (71 %) apresenta-se com tamanhos acima de 100 nm o que é perfeitamente compatível com um procedimento de extrusão para padronizar a população para dimensões semelhantes às dos lipossomas dos estudos de partição. A grande vantagem deste procedimento relativamente à reconstituição por diluição, reside no modo assimétrico de inserção membranar da proteína que resulta em populações de proteolipossomas com orientação unidireccional e dependente das características intrínsecas da proteína a inserir^(81, 83, 84, 94, 264, 265) (Figura III-20 B).

A exacta orientação de OmpF nas bicamadas após inserção em lipossomas (ou bicamadas planares) pré-preparados (as) é algo que carece ainda de maior confirmação experimental, estando actualmente fundamentada em evidências. A simulação molecular⁽²⁶⁶⁾ evidencia uma provável disposição de OmpF em bicamadas de DMPC semelhante à observada na membrana externa (superfície com ansas de maiores dimensões para o exterior bacteriano). Adicionalmente, também os estudos em bicamada fosfolipídica planar, baseados na assimetria da condutividade eléctrica de OmpF⁽¹⁹²⁾, defendem que o modo de inserção na bicamada se processa de forma oposta ao que acontece *in vivo*, ou seja, o compartimento aquoso a que se adiciona a proteína representa comparativamente o exterior bacteriano e a superfície proteica que primeiro contacta com a bicamada é aquela que apresenta as ansas de menores dimensões (T₁-T₈) ficando exposta ao meio aquoso

externo a superfície de ansas mais longas (L_1 - L_8), e resultando no final a mesma disposição membranar verificada *in vivo* (Figura III-21).

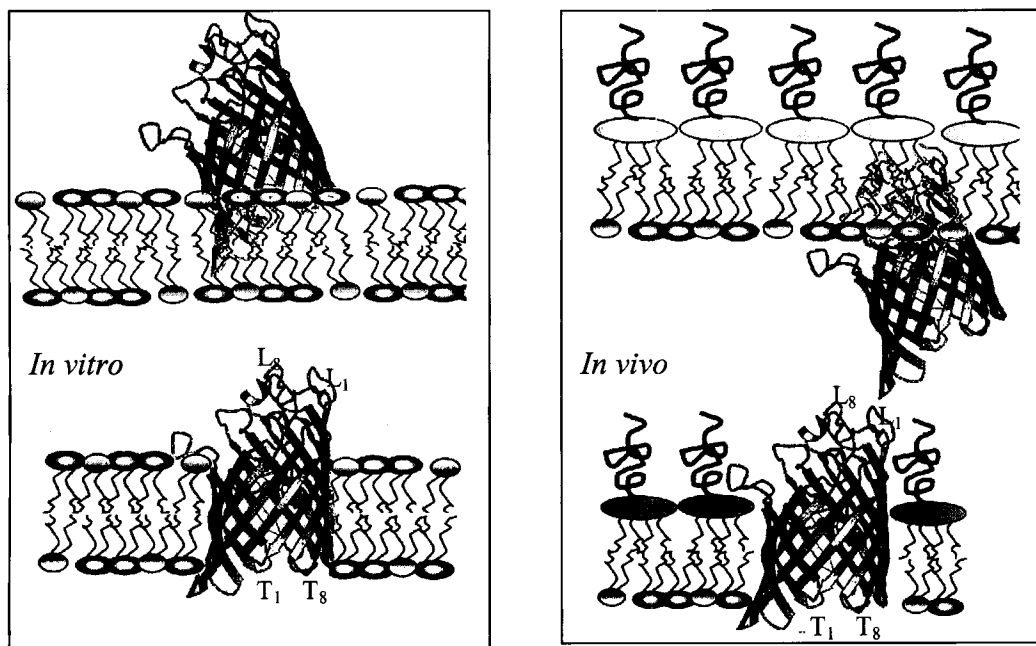


Figura III-21: Esquema representativo da orientação de inserção de OmpF em bicamada planar ou em LUVs pré-preparados (*in vitro*), comparativamente à orientação de inserção *in vivo*, na membrana externa bacteriana.

Adicionalmente, a rápida diminuição da quantidade de detergente, inerente à metodologia de reconstituição por diluição da mistura micelar, é normalmente associada à formação de proteolipossomas pouco homogêneos no que respeita à proporção proteína/lípido⁽⁸³⁾, o que resulta numa vantagem adicional para a metodologia de inserção em lipossomas pré-preparados pois a remoção da quantidade destabilizante de detergente foi efectuada por adsorção a superfície dos Bio-Beads[®], que consiste caracteristicamente numa remoção lenta e gradual⁽⁸³⁾. Por outro lado, o uso de Bio-Beads[®], em proporções e períodos de tempo adequados, garante ainda a total remoção do detergente presente na mistura, o que constitui uma mais valia para estudos de transporte membranar em que as características de permeabilidade membranar se pretendem controladas a valores reduzidos como forma de evitar resultados inconclusivos^(83, 84).

Assim, por todos os factores e vantagens descritas acima o procedimento de reconstituição adoptado para a preparação de proteolipossomas, para serem utilizados em estudos de interacção com as quinolonas, foi o de inserção em lipossomas pré-preparados.

2.3 Evidências de inserção em vesículas lipossômicas de DMPC:

Proteolipossomas obtidos por inserção de OmpF em LUVs pré-preparados

As provas de um processo de reconstituição bem sucedido relacionam-se normalmente com alterações mensuráveis de propriedades da proteína ou com alterações à normal organização da estrutura de inserção proteica. Sob esta perspectiva, o procedimento de reconstituição selecionado (inserção em lipossomas pré-preparados) foi acompanhado por espectroscopia de fluorescência, com base na fluorescência intrínseca da proteína e nas variações da anisotropia de fluorescência das sondas DPH e TMA-DPH incorporadas em lipossomas e proteolipossomas de DMPC.

2.3.1 Alterações aos espectros de emissão de fluorescência de OmpF

Uma característica importante da fluorescência intrínseca das proteínas é a elevada sensibilidade do triptofano às alterações do ambiente em que se encontra. Frequentemente, são observadas alterações no espectro de emissão de uma proteína como resposta a uma transição conformacional da proteína, por associação/dissociação das possíveis subunidades que a constituem, por desnaturação ou muito simplesmente por alteração do ambiente em que a proteína se insere ^(262, 267, 268).

Em procedimentos de reconstituição de proteínas membranares, as variações dos espectros de emissão de fluorescência fornecem informações valiosas no que respeita aos diferentes estados conformacionais da proteína ao longo do procedimento ou denunciando a mudança do ambiente em que se encontra a proteína. No caso concreto da porina OmpF este tipo de abordagem permitiu o acompanhamento das diferentes fases de reconstituição e reorganização proteica partindo de solução de proteína desnaturada ⁽²⁶²⁾. No entanto, quando se pretende reconstituir esta proteína partindo de uma solução micelar em que esta se apresenta com a sua conformação nativa, as variações do seu espectro de emissão de fluorescência quando em solução micelar ou inserida em bicamada lipídica podem apresentar-se pouco perceptíveis. Na Figura III-22 encontram-se representados os espectros de emissão de fluorescência de OmpF em solução micelar de detergente (oPOE), em solução de micelas mistas de oPOE/DMPC e inserida em de LUVs de DMPC.

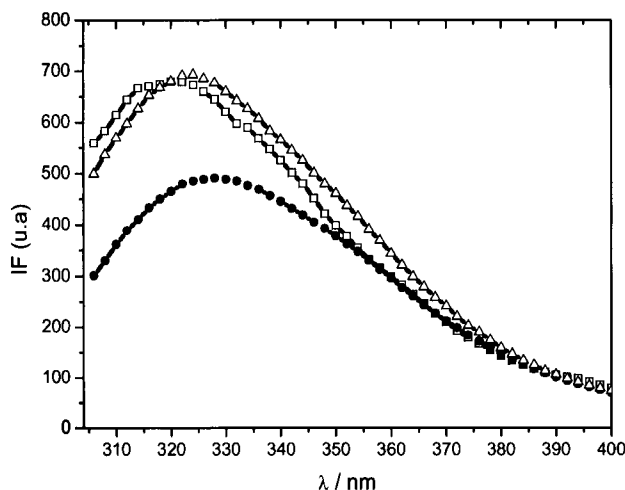


Figura III-22: Espectro de emissão de fluorescência de OmpF em meio micelar de oPOE (●-●-), em meio micelar de oPOE/DMPC (-Δ-) e inserida em LUVs de DMPC (-□-). Os comprimentos de onda máximos verificados para cada situação foram, respectivamente, 328, 324 e 322 nm ao comprimento de onda de excitação de 290 nm.

A região hidrófoba de OmpF em solução micelar encontra-se totalmente coberta pela zona hidrófoba do detergente, com as duas faixas circundantes de resíduos aromáticos a coincidir com a zona limite entre as regiões polar e não polar do detergente ⁽²⁶⁹⁾, localização coincidente com aquela determinada, por simulação molecular dinâmica, para a proteína inserida em bicamadas fosfolipídicas ⁽²⁶⁶⁾. Assim, quando se reconstitui OmpF partindo da situação em que a proteína se encontra em conformação muito próxima da nativa, e em ambiente de hidrofobicidade bastante semelhante ao da bicamada em que se vai inserir, verifica-se que as variações espectrais observadas (Figura III-22) não são tão acentuadas como as que se verificam quando se inicia o processo com a proteína em estado desnaturado (Tabela III-9), pois o ambiente circundante dos triptofanos de OmpF é, em qualquer uma das fases da reconstituição mediada por detergente, bastante semelhante.

Da análise dos espectros da Figura III-22, notam-se desvios para menores comprimentos de onda, ainda que ligeiros, à medida que se caminha no sentido da inserção em bicamada fosfolipídica o que constitui evidência da inserção da proteína em ambientes sucessivamente mais hidrófobos ⁽³⁹⁾. Note-se que a inclusão de uma fracção lipídica (DMPC) nas estruturas micelares provoca um deslocamento de 4 nm para comprimentos de onda menores, o que constitui indicação da presença do lípido resulta num aumento da hidrofobicidade do ambiente circundante dos triptofanos. Quando se compara a inserção em proteolipossomas com a fase de micelas mistas o desvio notado é apenas de 2 nm o que sugere maior semelhança na conformação proteica adoptada nestes dois ambientes estruturalmente distintos.

Conformação inicial de OmpF					
Desnaturada ^b			Conformação nativa em solução micelar		
Meio de inserção	Sol. Aq. de ureia (8M)	Vesículas de DMPC	Micelas de oPOE	Micelas oPOE/DMPC	Vesículas de DMPC
$\lambda_{\text{máx}}$ de emissão (nm)	350	318	328	324	322

Tabela III-9: Desvios espectrais verificados nos espectros de emissão de fluorescência de OmpF em diferentes fases de reconstituição membranar. ^a A comparação efectuada atende apenas à variação do $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão e não aos diferentes valores de $\lambda_{\text{máx}}$ apresentados. ^b Valores obtidos da referência [262], ao comprimento de onda de excitação de 290 nm.

2.3.2 Alterações à organização estrutural das vesículas lipossômicas: anisotropia de fluorescência

A presença de uma proteína transmembranar numa bicamada fosfolipídica é normalmente associada a alterações da organização desta estrutura. Esta perturbação imposta pela presença da proteína, se de pequena intensidade, poderá confinar-se aos lípidos adjacentes à estrutura proteica, ou, se implicar adaptações maiores, estender-se a vários níveis lipídicos até que a bicamada recupere a sua normal organização ⁽²⁷⁰⁾.

Todas as proteínas membranares integrais têm um domínio hidrofóbico característico que atravessa o centro hidrofóbico da bicamada, as dimensões desse domínio devem ser compatíveis com a espessura hidrofóbica da bicamada em que se inserem, pois existe elevado custo energético na exposição à água, quer das cadeias carbonadas dos fosfolípidos, quer dos aminoácidos hidrofóbicos da proteína ^(253, 270, 271). Assim, quando o ajuste das zonas hidrofóbicas da proteína e da bicamada não é perfeito, desencadeiam-se distorções à normal organização estrutural quer da bicamada quer da própria proteína ou de ambos, de forma a minimizar as diferenças ⁽²⁵³⁾. Porém, no caso concreto de OmpF cuja estrutura secundária é, predominantemente, em camada β , os estudos de determinação de constantes de ligação lipídica ⁽²⁷²⁾ têm vindo a sugerir que a predominância de camada β impõe rigidez à estrutura proteica, pelo que as distorções conformacionais de adaptação a diferentes espessuras hidrofóbicas das bicamadas de inserção são sempre bastante subtis ⁽²⁷³⁾, ficando a tarefa de compatibilização das zonas hidrófobas entregue à capacidade de acomodação da respectiva bicamada. Quando a espessura transmembranar hidrofóbica da proteína não iguala a espessura hidrofóbica da bicamada, esta compensa esse desajuste esticando ou compactando as moléculas lipídicas circundantes da proteína o que

consequentemente desencadeia uma perturbação membranar característica do sistema de reconstituição em estudo⁽²⁷¹⁾.

No estudo efectuado, os efeitos da presença de OmpF na ordem estrutural da bicamada fosfolipídica de DMPC, foram investigados por determinação da anisotropia de fluorescência das sondas DPH e TMA-DPH incorporadas em lipossomas de DMPC contendo ou não a porina inserida. Mais uma vez se realça a localização distinta das sondas de fluorescência usadas, com o DPH embebido na bicamada e o TMA-DPH ancorado na interface aquosa, permitindo obter informação dos efeitos da inserção membranar de OmpF desde a região da interface até ao centro hidrofóbico da bicamada.

A relação entre a anisotropia de fluorescência das sondas DPH e TMA-DPH incorporadas em lipossomas de DMPC ou proteolipossomas de DMPC/OmpF, em função da temperatura, encontra-se representada na Figura III-23. Salienta-se que as proporções molares OmpF/DMPC utilizadas nas misturas de reconstituição forma sempre na ordem de 1:1000, o que tratando-se de um valor relativamente baixo vem reduzir as probabilidades de proximidade entre a proteína e as sondas utilizadas. Desta forma, os efeitos sentidos sobre a anisotropia destas sondas são relativos a alterações da estrutura lipídica e não por interacção com a proteína.

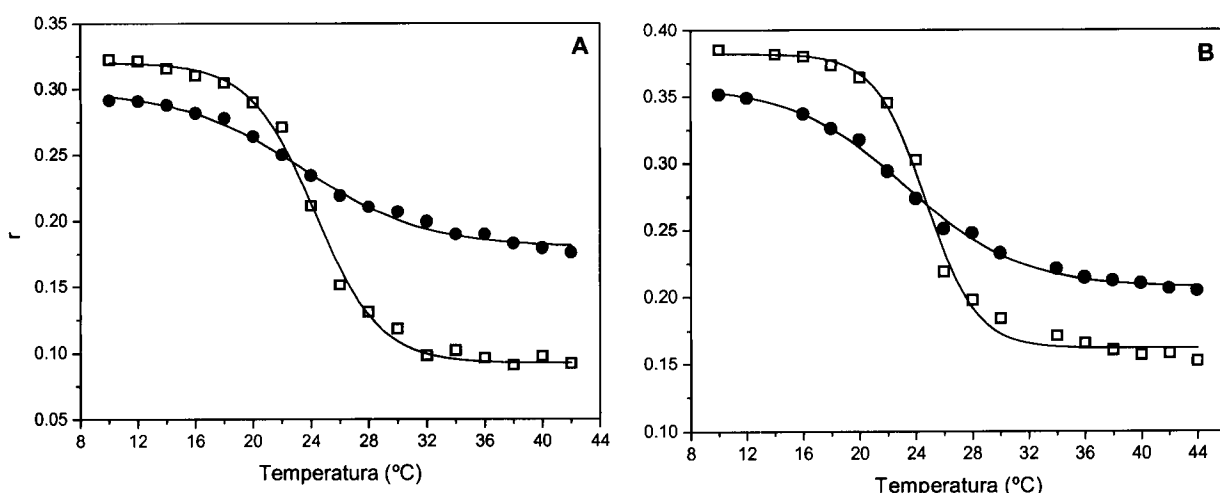


Figura III-23: Variação, com a temperatura, da anisotropia de fluorescência (r) das sondas DPH (A) e TMA-DPH (B), incorporadas em LUVs (□) e em proteolipossomas (●) de DMPC. Os valores apresentados são o resultado de pelo menos três determinações independentes, com cada um dos pontos a distar num máximo de 5 % do valor médio apresentado.

Os perfis de variação da anisotropia de fluorescência, em função da temperatura, em lipossomas e em proteolipossomas, mostram-se substancialmente diferentes, resultado que é verificado para ambas as sondas. Assim, na ausência de OmpF, o aumento de

temperatura desencadeia uma diminuição monotónica dos valores de anisotropia das sondas, com decréscimos abruptos, típicos, na zona de transição de fase. Nos proteolipossomas, a variação da anisotropia com o aumento da temperatura é muito menos acentuada que a verificada nos lipossomas, verificando-se uma diminuição da anisotropia na fase de gel, e um aumento acentuado na fase fluida. Comparando as variações obtidas com cada uma das sondas verifica-se que o aumento de anisotropia em presença de OmpF, na fase fluida, foi mais intensamente sentido pelo DPH ($\Delta r = 0,08$) que pelo TMA-DPH ($\Delta r = 0,05$).

	Lipossomas	Proteolipossomas
	$T_m (^{\circ} C)$	$T_m (^{\circ} C)$
DPH	$24,3 \pm 0,2$	$24,2 \pm 0,4$
TMA-DPH	$24,7 \pm 0,2$	$23,3 \pm 0,3$

Tabela III-10: Temperaturas de transição de fase (T_m) para lipossomas de DMPC e proteolipossomas OmpF/DMPC. Valores obtidos a partir do ponto de inflexão do modelo sigmoidal representado na Figura III-23. Os valores correspondem à média e desvio padrão de pelo menos três ensaios independentes.

Relativamente à zona de transição de fase, esta sofre um alargamento sentido pelas duas sondas, com o valor da temperatura de transição de fase a manter-se constante para o DPH e a sofrer um decréscimo de $\sim 1^{\circ} C$ com a sonda TMA-DPH (Tabela III-10).

A espessura da zona membranar (hidrofóbica) de OmpF, obtida a partir da distância entre a faixa superior e inferior de resíduos aromáticos que marcam o início das zonas de interface, é de $24 \text{ \AA}$ ⁽²⁵³⁾, e o valor médio da espessura hidrofóbica de uma bicamada de DMPC, obtido a partir dos valores médios da espessura da bicamada em fase de gel ($32 \pm 1 \text{ \AA}$) e em fase fluida ($23 \pm 1 \text{ \AA}$), é de $28 \text{ \AA}$ ^(270, 274), consequentemente, a compatibilidade das espessuras hidrofóbicas da proteína e da bicamada de DMPC, apesar de bastante próxima do ideal, ainda requer alguns ajustes membranares, tal como denunciam as variações entre os valores de anisotropia de lipossomas e proteolipossomas.

Abaixo da temperatura de transição a disposição de maior ordem e rigidez estrutural desencadeia uma espessura hidrofóbica da bicamada cuja acomodação da proteína requer uma diminuição da ordem estrutural, denunciando ultrapassar a espessura hidrofóbica de OmpF, embora a variação imposta nos valores de anisotropia se mostre de pequena amplitude. Em fase fluida, o aumento dos valores de anisotropia reflecte um aumento da ordem estrutural perante a presença da proteína, tal efeito foi sentido por ambas as sondas porém mostrou-se mais pronunciado para o DPH o que é sugestivo de que o maior

contributo para o ordenamento estrutural provém da zona das cadeias hidrocarbonadas, também incluída na zona sensorial do TMA-DPH. Adicionalmente, com o TMA-DPH verificou-se, nos proteolipossomas, um decréscimo na temperatura de transição o que, normalmente, é associado a decréscimos na ordem estrutural da zona da interface aquosa. Assim, o conjunto de resultados obtido evidencia um efeito de desorganização estrutural na zona das cabeças polares fosfolipídicas, como provável consequência da acomodação de OmpF nessa região, esse efeito é acomodado pela membrana forçando a uma maior compactação ao nível das cadeias carbonadas.

Uma possível justificação deste efeito de OmpF sobre a região polar da bicamada poderá advir das características das superfícies externas de OmpF (extremidades não membranares) maioritariamente constituídas por aminoácidos carregados negativamente a pH 7,4 ^(24, 33, 253), e normalmente, envolvidas em interacções de estabilização membranar com o LPS da membrana externa ⁽²⁵³⁾. Na ausência deste constituinte membranar a definição da organização estrutural das zonas proteicas de localização interfacial terá de ser desempenhada pela região das cabeças polares, de ião dipolar do DMPC que, consequentemente, são submetidas à desorganização estrutural imposta por possíveis interacções electrostáticas ^(140, 247) (Figura III-24). Confirmando esta previsão, simulações moleculares envolvendo a inserção de OmpF em bicamadas de DMPC ⁽²⁶⁶⁾ têm vindo a demonstrar que a presença da proteína desencadeia aumentos significativos na permeabilidade catiónica da membrana, como consequência da interacção da sua superfície externa com o grupo colina das cabeças polares do DMPC que resulta numa maior exposição do grupo fosfato de localização relativamente mais interna.



Figura III-24: Representação esquemática de um monómero de OmpF inserido numa bicamada. Possíveis efeitos da presença da proteína na bicamada: interacção electrostática (seta curva) e efeito de ordenamento das cadeias hidrocarbonadas (setas horizontais). Adaptado da referência [275].

Abaixo da temperatura de transição, apesar de se denotarem alterações estruturais decorrentes do desajuste hidrofóbico entre a proteína e a bicamada, não são evidentes as diferenças de efeitos sobre as diferentes regiões da bicamada, facto que confirma a maior susceptibilidade da fase fluida a perturbações externas como a presença de proteínas ⁽¹⁴⁴⁾. Adicionalmente, esta dualidade de comportamento membranar inerente ao estado físico em

que se encontra a bicamada, justifica a alternância de temperaturas frequentemente referida em procedimentos de reconstituição ^(206, 246, 270), e utilizada neste trabalho na reconstituição de OmpF, como auxiliar de uma melhor reorganização membranar da proteína e, paralelamente, como factor de aumento das percentagens de inserção membranar.

3. Interação das Quinolonas com OmpF

Desde a introdução na terapêutica do AN (~1962), que têm sido desenvolvidas novas gerações de quinolonas com o intuito de se alargar o espectro de actividade antibacteriana e também na tentativa de resolução de problemas de resistência que se foram manifestando ⁽²⁷⁶⁾. Algumas das formas de resistência às quinolonas estão estritamente relacionadas com alterações na expressão bacteriana das porinas, nomeadamente, na expressão de OmpF ^(16, 220). Porém, a importância da presença desta porina quer como canal de difusão hidrofílica das quinolonas ou como mero agente promotor de uma difusão na interface lípido/proteína, e consequentemente, a sua importância para a entrada destes antibióticos na célula bacteriana de Gram (-), é algo que carece ainda de esclarecimento.

Assim, na tentativa de melhor se perceber a importância de OmpF na transposição das barreiras bacterianas pelas quinolonas, ao longo dos estudos expostos neste item, promoveu-se a interação de OmpF com quatro quinolonas representativas de diferentes gerações, procurando obter conhecimento qualitativo e quantitativo da interação destes antibióticos com a porina OmpF.

3.1 Extinção de fluorescência de OmpF pela acrilamida e pelo ião iodeto na ausência e em presença das quinolonas

São numerosos os estudos que recorrem à elevada sensibilidade dos Trp proteicos com as alterações do ambiente circundante, como forma de obter conhecimento de alterações na estrutura proteica em resposta a inserção em diferentes ambientes, ou à ligação de um qualquer substrato ⁽²⁷⁷⁻²⁸²⁾. Neste estudo, recorreu-se à extinção da fluorescência de OmpF pela acrilamida e pelo ião iodeto, como forma de averiguar o efeito da presença das quinolonas sobre o ambiente circundante dos Trp de OmpF, e desta forma tirar relações sobre uma possível localização da interação destes antibióticos com o canal porínico.

O trímero que constitui a estrutura quaternária de OmpF apresenta apenas dois resíduos de Trp por monómero, o Trp²¹⁴ na interface lípido/proteína e o Trp⁶¹ na interface dos monómeros (Figura III-25) ^(206, 253). Relativamente às características de hidrofobicidade do ambiente em que estes Trp se inserem, os espectros de emissão de fluorescência de OmpF, apresentam um máximo a comprimentos de onda relativamente baixos (Figura III-22) o que é sugestivo de uma localização destes Trp em ambientes de elevada hidrofobicidade ⁽³⁹⁾. Adicionalmente, estudos com recurso à microscopia electrónica ⁽¹¹²⁾, e a mutantes de

OmpF, em cuja estrutura se omitiu um ou ambos os Trp⁽²³⁾, para além de confirmarem a hidrofobicidade dos meios em que se inserem estes Trp, realçam uma hidrofobicidade mais acentuada na zona de interface dos monómeros onde se localiza o Trp⁶¹.

Quanto aos agentes de extinção de fluorescência utilizados, o ião iodeto e a acrilamida, a sua selecção teve por base a sua distinta acessibilidade aos diferentes triptofanos de OmpF. Relativamente ao ião iodeto, são numerosos os estudos que comprovam a sua capacidade de permeação membranar^(39, 283, 284), porém, dado tratar-se de uma partícula carregada negativamente a sua acção é susceptível de modulação através de interacções de índole electrostático^(133,285-287). Assim, tratando-se OmpF de um canal iónico com selectividade catiónica, em que consequentemente existe relativa abundância periférica de cargas negativas^(23, 24, 33, 253), facilmente se depreende que a acessibilidade do ião iodeto se restrinja ao Trp²¹⁴. Por outro lado, a acrilamida, tratando-se de uma molécula pequena, de características polares mas sem carga efectiva, consegue facilmente aceder ao Trp⁶¹, porém, a fluorescência do Trp²¹⁴ não sofre extinção pela acrilamida já que esta molécula se mostra incapaz de extinguir a fluorescência de fluoróforos de localização membranar^(39, 134, 284, 288). Para a acrilamida a eficiência de extinção de fluorescência mostra-se independente da polaridade do micro-ambiente que circunda o fluoróforo, ficando apenas limitada por possíveis efeitos de bloqueio estérico^(39, 135, 284), que constituem impedimento no caso do Trp²¹⁴, embebido no ambiente membranar, mas não para o Trp⁶¹ pois os monómeros apresentam-se separados por uma distância de aproximadamente 35 Å (de acordo com resultados de estudos de raios-X⁽²³⁾) distância suficiente para acomodar a molécula de acrilamida, cuja extensa utilização nos mais variados estudos bioquímicos tem evidenciado a sua capacidade de extinção de fluorescência de triptofanos profundamente embebidos em estruturas proteicas^(155, 287, 289).

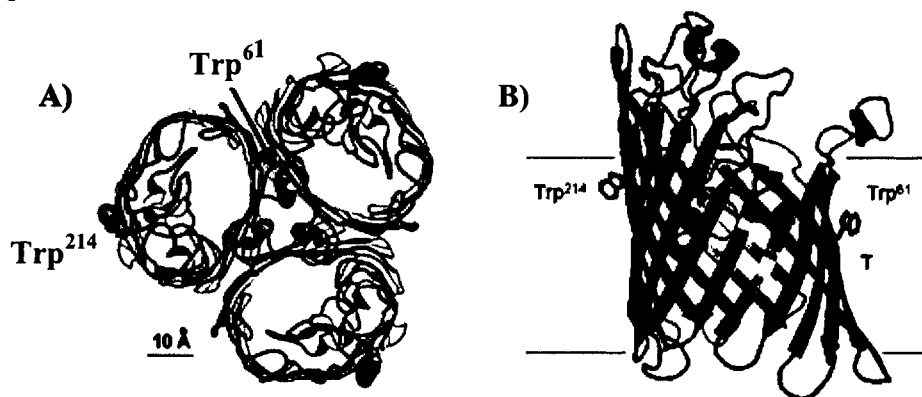


Figura III-25: Organização estrutural de OmpF. As posições dos resíduos de Trp em cada monómero encontram-se evidenciadas em cada uma das imagens. Em (A) apresenta-se a vista da topo e em (B) uma disposição perpendicular ao eixo membranar. A zona de interface dos monómeros está assinalada, na figura (B), com letra T. Adaptado das referências [206] e [253].

Os estudos de extinção à fluorescência de OmpF foram realizados de forma a se obterem resultados relativos à proteína inserida em diferentes tipos de estrutura organizada. A primeira, e mais simples das abordagens, foi realizada com a proteína inserida em micelas mistas de detergente (oPOE) e fosfolípido (DMPC ou DMPG) e posteriormente os mesmos estudos foram realizados com a proteína inserida em LUVs de DMPC.

A utilização das micelas mistas em estudos de fluorescência apresenta as vantagens inerentes à sua simplicidade e rapidez de preparação, e às reduzidas dimensões destas estruturas, que lhes permite serem praticamente transparentes^(290, 291).

A realização de estudos de extinção de fluorescência do Trp livre em solução de composição idêntica à utilizada nos estudos com a proteína, teve como principal objectivo proporcionar uma ordem de grandeza da eficácia dos agentes de extinção em extinguir a fluorescência emitida pelo Trp em diferentes meios circundantes. Salienta-se que em todos estes estudos envolvendo o triptofano livre, a concentração de aminoácido nos diversos ensaios foi sempre de valor próximo ou igual ao valor da concentração de triptofano presente na quantidade de OmpF utilizada por ensaio.

Cálculo das constantes de Stern-Volmer: Todos os resultados foram analisados com base na equação de Stern-Volmer (Capítulo I, item 4.2.1, equação 3.0) para a extinção de fluorescência colisional. Porém, ao longo de todo este estudo a linearidade expressa na equação 3.0 só se verificou para a extinção de fluorescência do triptofano livre (isto é, não integrado na estrutura de OmpF), em todos as restantes situações experimentais envolvendo a extinção da fluorescência de OmpF, e portanto a fluorescência de triptofanos distintos quanto ao acesso do agente de extinção, a representação gráfica da expressão de Stern-Volmer (IF_0/IF vs [Agente de Extinção]) originou desvios negativos à linearidade (Figura III-26). Nesses casos, o processo de extinção de fluorescência adequa-se melhor à expressão modificada da equação de Stern-Volmer representada pela equação 3.7 (Capítulo I, item 4.2.1), dado tratar-se de uma situação de acesso diferenciado dos agentes de extinção aos diferentes triptofanos de OmpF.

Assim, depois de efectuadas as devidas correcções espectrais (Capítulo I), procedeu-se ao cálculo das constantes de Stern-Volmer e respectivas fracções acessíveis por ajuste não linear às equações 3.0 e 3.7 para o triptofano livre e integrado na estrutura de OmpF, respectivamente.

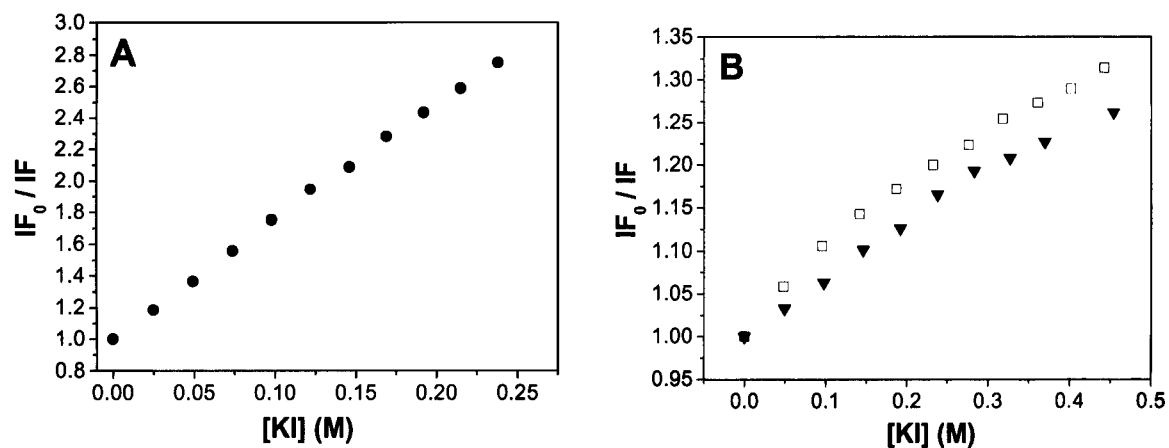


Figura III-26: Representação gráfica da relação de Stern-Volmer para a extinção de fluorescência pelo iodeto ao Trp livre (A) em solução micelar de oPOE/DMPC (●) e ao Trp de OmpF (B), com a proteína inserida em micelas mistas de oPOE/DMPC (□) e oPOE/DMPG (▲). Em (A), concentração de Trp é de ~3,1 μ M e em (B), a concentração de OmpF é de 0,56 μ M.

3.1.1 Estrutura de inserção, composição lipídica e alterações conformacionais de OmpF

Os resultados da Tabela III-11 revelam as alterações à extinção de fluorescência de OmpF e do Trp, pelo iodeto e pela acrilamida, nos diferentes meios micelares em que se efectuou o estudo. Os valores correspondem à média e desvio padrão de pelo menos três ensaios independentes. No caso da extinção de fluorescência do Trp, os valores obtidos são provenientes de relações lineares, tendo-se obtido em cada uma das situações expostas coeficientes de correlação (R^2) iguais ou superiores a 0,995.

	Iodeto		Acrilamida	
	K_a (M^{-1})	f_a	K_a (M^{-1})	f_a
Trp MicMisDMPC	$8,0 \pm 0,1$	1,0	$11,0 \pm 0,1$	1,0
Trp MicMisDMPG	$7,2 \pm 0,1$	1,0	$12,0 \pm 0,1$	1,0
OmpF MicMisDMPC	$2,8 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,1$	$3,8 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$
OmpF MicMisDMPG	$1,4 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$	$4,2 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$

Tabela III-11: Valores das constantes de Stern-Volmer (K_a) e fracção acessível (f_a) para a extinção de fluorescência pelo iodeto e pela acrilamida ao Trp e a proteína OmpF, nos diferentes meios micelares em que se efectuou o estudo.

No que respeita aos resultados do Trp a primeira informação que se pode extrair advém das diferenças notadas como resultado da alteração da composição lipídica do meio micelar. Para o iodeto o padrão de extinção de fluorescência em presença de lípido carregado negativamente mantém-se constante, verificando-se um decréscimo na sua eficácia de extinção de fluorescência. Quanto à acrilamida a variação sentida é bastante semelhante, porém, verifica-se em sentido oposto, ou seja, ocorre um aumento na sua eficácia de extinção de fluorescência em meio micelar com DMPG. Uma possível explicação para as variações notadas poderá residir na natureza anfifílica do triptofano, isto é, na sua preferência por uma localização em região de interface do meio aquoso com as zonas apolares dos agregados micelares (ou lipossómicos) ⁽²⁵³⁾, e portanto numa possível partição deste aminoácido nas micelas de diferente composição que se evidencia mais forte no caso das estruturas contendo DMPG. Uma vez assumida esta possibilidade, o sentido oposto da variação verificada para cada um dos agentes de extinção, pode ser explicado por um aumento da probabilidade de contacto, por maior imobilização do fluoróforo, no caso da acrilamida, e por um decréscimo resultante de efeitos de repulsão electrostática no caso do iodeto.

Quando se compara os resultados obtidos para o Trp relativamente a OmpF, verifica-se que as alterações às constantes de Stern-Volmer se manifestam no mesmo sentido em ambas as situações, contudo, a intensidade com que essas alterações se manifestam numa ou noutra situação revelam-se bastante diferentes, evidenciando que no caso de OmpF existem razões adicionais a influenciar os valores obtidos.

Numa segunda abordagem aos resultados contidos na Tabela III-11, realçam-se os valores das fracções de fluorescência acessíveis a cada um dos agentes de extinção, no meio micelar de DMPC. Se ambos os agentes de extinção apresentassem um valor de f_a de 0,5 isso significaria que cada um destes agentes teria acesso a metade da fluorescência emitida pelos Trp de OmpF ⁽³⁹⁾, contudo, como se pode verificar pela análise da tabela, a acrilamida apresenta um valor de f_a superior ao do iodeto, o que se explica com uma diferenciação na intensidade de fluorescência emitida por cada um dos grupos de Trp presentes em OmpF ⁽³⁹⁾. Tal como se expôs previamente, cada um dos três monómeros de OmpF apresenta apenas dois Trp, tendo-se demonstrado através de evidências experimentais devidamente documentadas ^(23, 206), que o Trp⁶¹ se encontra em ambiente de maior hidrofobicidade que o Trp²¹⁴, sendo portanto responsável por um maior contributo para o total de intensidade de fluorescência emitido. Ou seja, o valor mais elevado de f_a apresentado pela acrilamida é o resultado do acesso diferenciado desta agente de extinção

de fluorescência ao Trp⁶¹, confirmando-se desta forma o anterior pressuposto de que a acrilamida extingue a fluorescência do Trp⁶¹, sendo atribuída ao iodeto a extinção da porção de fluorescência proveniente do Trp²¹⁴.

Comparando os resultados obtidos para a extinção de fluorescência de OmpF pelo KI em meio micelar de oPOE/DMPG, com os obtidos com a proteína inserida em micelas mistas de oPOE/DMPC, verifica-se que o valor de f_a apresenta um aumento enquanto que a constante de Stern-Volmer sofre marcado decréscimo. Na membrana nativa OmpF dispõe o Trp²¹⁴ na região limite entre a zona apolar e a zona polar da bicamada ⁽²⁵³⁾, porém, *in vitro* os resultados obtidos em presença de uma componente lipídica carregada negativamente, evidenciam um provável rearranjo conformacional, com o Trp²¹⁴ a adquirir nova localização, mais profundamente inserido em zona hidrofóbica, daí resultando um aumento no contributo deste Trp para a fluorescência total emitida, que se traduz num aumento do valor de f_a , e paralelamente, tratando-se de um processo de extinção de fluorescência dinâmico e portanto estritamente dependente de contacto ⁽³⁹⁾, o valor da constante de Stern-Volmer sofre decréscimo como resultado de um maior bloqueio estérico e repulsivo no acesso do iodeto.

Adicionalmente, a introdução de uma componente lipídica carregada negativamente permitiu obter mais uma confirmação do acesso diferenciado de cada um dos agentes de extinção aos diferentes Trp de OmpF. Para o iodeto, carregado negativamente e portanto sujeito a efeitos de repulsão electrostática por parte de componentes de carga negativa efectiva, foi observado um decréscimo no valor da constante de Stern-Volmer, o que denuncia uma diminuição na eficiência de extinção de fluorescência por parte deste agente quando a proteína se encontra inserida em ambiente micelar com DMPG. No que respeita à extinção de fluorescência pela acrilamida, verifica-se apenas um ligeiro aumento da constante, evidenciando que a área proteica a que este agente acede mantém-se praticamente indiferente aos efeitos da variação da componente lipídica. Esta diferença de comportamento manifestada por cada um dos agentes de extinção de fluorescência perante as alterações à componente lipídica, confirma uma vez mais o pressuposto inicial de um acesso diferenciado destes agentes aos diferentes triptofanos de OmpF. Ou seja, uma alteração da componente lipídica não justifica grandes alterações ao nível da interface dos trímeros, e este facto reflecte-se nos resultados de extinção de fluorescência pela acrilamida em que se verificam apenas ligeiras alterações aos valores anteriores, paralelamente, ao nível da interface lípido/proteína, a fluorescência do Trp²¹⁴ sofre os efeitos dos rearranjos estruturais de OmpF em adaptação à nova componente lipídica,

evidenciando nova localização em ambiente de hidrofobicidade acrescida, que resulta num aumento da sua contribuição para a fluorescência total, e um decréscimo aos valores da constante de Stern-Volmer para a extinção de fluorescência pelo iodeto, pois este agente fica sujeito a efeitos repulsivos.

Os valores agrupados na Tabela III-12, têm como principal objectivo facultar uma escala comparativa da eficiência e acessibilidade dos agentes de extinção usados em extinguir a fluorescência do Trp nas diferentes estruturas organizadas usadas.

	Iodeto		Acrilamida	
	K_a (M^{-1})	f_a	K_a (M^{-1})	f_a
Trp MicMisDMPC	$8,0 \pm 0,1$	1,0	$11,0 \pm 0,1$	1,0
OmpF/Proteolipossomas	$6,4 \pm 0,4$	$0,3 \pm 0,1$	$8,8 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,1$
OmpF/MicMisDMPC	$2,8 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,1$	$3,8 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$

Tabela III-12: Comparação da extinção de fluorescência pelo iodeto e pela acrilamida, à fluorescência do Trp livre, em meio de solução micelar de oPOE/DMPC, e de OmpF inserida em micelas mistas de oPOE/DMPC e em proteolipossomas de DMPC.

Os valores acima sumariados confirmam a previsão teórica de que a acessibilidade do Trp aos agentes de extinção diminui com a passagem do Trp do estado de molécula livre, para a situação de aminoácido integrado na estrutura de OmpF. Contudo, a acessibilidade e intensidade de fluorescência dos Trp integrados na estrutura proteica, também evidencia efeitos decorrentes do tipo de estrutura organizada em que se insere a proteína. Quando a proteína se encontra inserida em estrutura micelar a eficiência com que o agente de extinção exerce a sua acção mostra-se muito menor do que aquela observada com a proteína inserida em lipossomas. Uma possível explicação para estes resultados reside provavelmente na organização estrutural adoptada pela proteína perante as diferentes características químicas e estruturais inerentes aos dois tipos de estrutura. A inserção da proteína quer em micelas mistas, quer em lipossomas garante a preservação das características básicas da conformação nativa, o que se confirma pelos resultados de electroforese (Figura III-19), porém, os ajustes conformacionais inerentes à actividade da proteína tornam-se possíveis apenas com a proteína inserida nos lipossomas, não só pela organização estrutural em bicamada, que garante um melhor encaixe hidrofóbico da estrutura proteica, como também pela presença do compartimento aquoso interno que permite uma melhor acomodação das extremidades hidrofílicas da proteína e da organização funcional como canal iónico. Assim, este ajuste conformacional adoptado por

OmpF quando inserida em lipossomas, parece permitir uma maior acomodação molecular em diferentes zonas da estrutura proteica, o que poderá justificar a maior eficiência no contacto dos agentes de extinção com os Trp a que acedem. Adicionalmente, uma possível partição dos agentes de extinção nas estruturas de inserção, de maior intensidade no caso dos proteolipossomas, dado existir maior superfície de interação e de acomodação molecular, pode também contribuir para a diferença verificada entre o sistema micelar e os proteolipossomas dado que a maior proximidade do agente de extinção aos fluoróforos facilita a sua acção ⁽²⁸⁷⁾.

A comparação da extinção pelo iodeto e pela acrilamida da fluorescência de OmpF, fazendo-se variar a composição e mesmo o tipo de estrutura de inserção permitiu distinguir a zona proteica a que cada um dos agentes de extinção acede, tendo-se definido um acesso diferenciado do iodeto ao Trp²¹⁴ e da acrilamida ao Trp⁶¹. Paralelamente, a realização deste tipo de estudo com a proteína inserida em estruturas distintas revela diferenças acentuadas no que respeita a eficiência de extinção de fluorescência de cada um dos agentes de extinção utilizados, o que constitui indicação de uma organização proteica distinta em cada uma das situações exploradas. Assim, o recurso às micelas mistas constitui uma abordagem preliminar mais simplista e com função orientadora para os estudos realizados com proteolipossomas, estes últimos mais próximos da realidade membranar graças à maior semelhança na organização estrutural proteica. Consequentemente, salienta-se a inaplicabilidade de comparações no que respeita aos resultados obtidos com os diferentes tipos de estrutura organizada pois a existência de diferenças na organização estrutural proteica reflectem-se forçosamente no perfil de extinção de fluorescência exercido por cada um dos agentes de extinção utilizado.

3.1.2 Extinção de fluorescência de OmpF inserida em micelas mistas oPOE/DMPC ou DMPG, em presença das QNs

Micelas mistas de oPOE/DMPC

A maior alteração introduzida à extinção da fluorescência de OmpF pelo iodeto foi notada em presença do AN que provocou uma diminuição acentuada do valor de K_a . A presença da CP e GP não introduz qualquer alteração, contudo, a presença da MX introduziu ligeiro aumento ao valor da constante e da respectiva fracção acessível (ver Tabela III-13). Assim, tendo em consideração o acesso diferenciado do iodeto ao Trp²¹⁴ e

os efeitos observados em presença de cada um dos antibióticos, facilmente se associa a interação do AN com a proteína ao nível da interface lípido/proteína, pois apenas este fármaco introduziu alteração significativa produzindo acentuado decréscimo ao valor de K_a muito provavelmente em consequência de bloqueio estérico à acção do iodeto por presença do antibiótico nessa área. Este tipo de explicação vem de encontro às características do AN, molécula de dimensões reduzidas (PM de ~232) que apresenta maior hidrofobicidade deduzida dos seus elevados valores de partição em ambientes hidrofóbicos ^(16, 227), e portanto com elevada facilidade de permeação através das zonas hidrófobas de ambientes micelares ou lipossómicos ⁽¹⁶⁾. Os restantes antibióticos em estudo, aparentam desenvolver a sua interação sem interferirem com o ambiente do Trp²¹⁴, exceptuando a MX cuja presença parece favorecer a extinção de fluorescência pelo iodeto. Esta alteração introduzida pela MX é claramente menos significativa que a observada para o AN, adicionalmente, causa o efeito inverso e portanto não seria lógico que resulta-se das mesmas causas. Assim, uma explicação mais viável irá preferencialmente centrar a interação da MX ao nível do canal hidrofílico de OmpF, na proximidade do Trp⁶¹, e apenas afectando o Trp²¹⁴ em consequência de uma possível alteração conformacional resultante da acomodação da MX no interior hidrofílico do canal proteico.

A extinção de fluorescência pela acrilamida não sofre alterações significativas em presença do AN, CP e GP, apenas a MX provoca um aumento nos valores de K_a e f_a (Tabela III-13). Estes resultados conjugados com os obtidos para a extinção de fluorescência pelo iodeto evidenciam uma diferenciação nos locais de interação dos diferentes antibióticos com a proteína, apontando claramente para uma interação do AN ao nível da interface lípido/proteína que se confirma pela ausência de alteração à extinção pela acrilamida. Contudo, a MX destaca-se, uma vez mais, pelo seu comportamento diferenciado, introduzindo um aumento ao valor do K_a para a extinção de fluorescência pela acrilamida. Este comportamento constitui indicação de uma possível interação com a proteína na proximidade ou com consequências sobre o Trp⁶¹ e portanto ao nível do canal hidrofílico.

	Sem fármaco		Ácido Nalidíxico		Ciprofloxacina		Grepafloxacina		Moxifloxacina	
	K_a	f_a	K_a	f_a	K_a	f_a	K_a	f_a	K_a	f_a
	(M^{-1})		(M^{-1})		(M^{-1})		(M^{-1})		(M^{-1})	
Acrilamida	3,8	0,6	3,5	0,6	3,1	0,6	3,6	0,6	5,1	0,6
/DMPC	($\pm 0,1$)	($\pm 0,1$)	($\pm 0,2$)	($\pm 0,1$)	($\pm 0,1$)	($\pm 0,1$)	($\pm 0,1$)	($\pm 0,1$)	($\pm 0,1$)	($\pm 0,1$)
Acrilamida	4,2	0,7	4,3	0,6	4,5	0,6	2,4	0,7	3,6	0,7
/DMPG	($\pm 0,1$)	($\pm 0,1$)	($\pm 0,1$)	($\pm 0,1$)	($\pm 0,3$)	($\pm 0,1$)	($\pm 0,1$)	($\pm 0,1$)	($\pm 0,2$)	($\pm 0,1$)
I $^-$	2,8	0,4	1,5	0,5	2,2	0,4	2,7	0,3	3,1	0,4
/DMPC	($\pm 0,2$)	($\pm 0,1$)	($\pm 0,3$)	($\pm 0,1$)	($\pm 0,1$)	($\pm 0,1$)	($\pm 0,2$)	($\pm 0,1$)	($\pm 0,2$)	($\pm 0,1$)
I $^-$	1,4	0,6	2,1	0,4	2,8	0,4	4,4	0,3	4,7	0,4
/DMPG	($\pm 0,1$)	($\pm 0,1$)	($\pm 0,1$)	($\pm 0,1$)	($\pm 0,1$)	($\pm 0,1$)	($\pm 0,1$)	($\pm 0,1$)	($\pm 0,2$)	($\pm 0,1$)

Tabela III-13: Constantes de Stern-Volmer e respectivas frações de fluorescência acessíveis, da extinção de fluorescência pela acrilamida e pelo iodeto aos Trp de OmpF inserida em meio micelar. A primeira coluna descreve o agente de extinção usado e a componente lipídica do sistema micelar. As concentrações de antibiótico usadas foram (μM): 27,9 (AN), 26,9 (CP), 27,9 (GP) e 27,9 (MX). Os valores expostos correspondem à média e desvio padrão de pelos três ensaios independentes.

Micelas mistas de oPOE/DMPG

A extinção da fluorescência de OmpF pelo iodeto apresenta alterações bastante significativas quando em presença de qualquer um dos antibióticos em estudo, verificando-se aumentos aos valores de K_a para todos os fármacos mas de forma mais acentuada em presença da GP e da MX (Tabela III-13).

O aumento do valor de K_a para a extinção de fluorescência pelo iodeto em presença do AN tem a sua justificação numa combinação de efeitos resultantes duma interação do fármaco com a proteína ao nível da interface lipídica. Assim, se por um lado a presença de moléculas de fármaco nessa área irá resultar numa normal destabilização da organização estrutural da micela e consequentemente aumentará a facilidade de acesso do iodeto através de áreas de carga neutralizada pela presença do fármaco. Por outro lado, a presença de moléculas de fármaco nessa área resulta também num aumento de bloqueio estérico ao acesso do iodeto que neste meio de inserção não assume as proporções anteriormente verificadas dada a localização menos periférica assumida pelo Trp²¹⁴, daqui resultando um equilíbrio dos efeitos que origina o ligeiro aumento de K_a .

A variação de maior significado à extinção de fluorescência de OmpF pelo iodeto é representada pelo aumento de K_a em presença da GP e da MX, e constitui o resultando da interação desses antibióticos a dois níveis distintos: primeiro, pela sua capacidade em

neutralizar as cargas negativas e em destabilizar as estruturas micelares através da sua ligação na interface da estrutura, aumentam a facilidade de acesso do iodeto ao Trp²¹⁴; por outro lado, a possível alteração conformacional da estrutura proteica decorrente da sua interação ao nível do canal hidrofílico parece também melhorar o acesso do iodeto ao seu alvo de acção. Relativamente à destabilização micelar, esta resulta da interação electrostática destes fármacos (parcialmente ionizados a pH 7,4) com as cargas negativas do DMPG. Este tipo de justificação tem a sua confirmação nos coeficientes de partição destas quinolonas em lipossomas de DMPG, cujos valores são consideravelmente superiores aos obtidos com lipossomas de DMPC, diferença ainda mais acentuada no caso da GP⁽¹¹⁾. Apesar do aumento verificado no valor de K_a ter adquirido a mesma amplitude para ambos os fármacos, salienta-se que os factores responsáveis por esse aumento tiveram contribuições distintas para cada um dos fármacos, sendo a destabilização micelar por interação electrostática o factor com maior contributo para o aumento notado no caso da GP, pois é dos dois fármacos aquele que apresenta maior percentagem de espécie catiónica a pH 7,4 (20% para a GP e 10% para a MX)⁽¹¹⁾. No caso da MX, a acção de destabilização da estrutura micelar constitui apenas parte das razões que justificam o aumento acentuado de K_a em presença deste fármaco, atribuindo-se a principal justificação às alterações conformacionais na estrutura proteica como resultado da interação deste antibiótico na proximidade do Trp⁶¹, justificação coerente com os resultados obtidos em micelas mistas de oPOE/DMPC que evidenciavam esta possibilidade apenas no caso da MX.

A extinção da fluorescência de OmpF pela acrilamida não demonstra qualquer alteração em presença quer do AN quer da CP, mas em presença da GP e da MX revela acentuado decréscimo no valor de K_a (Tabela III-13). O comportamento revelado em presença do AN evidencia uma vez mais que a interação deste antibiótico com OmpF está limitada à zona de interface lípido/proteína, sem qualquer consequência no ambiente do Trp⁶¹. Relativamente ao efeito da presença da GP e da MX os resultados apontam para uma interação ao nível do canal hidrofílico que constitui cada um dos monómeros de OmpF, o que consequentemente afecta o ambiente em que se insere o Trp⁶¹. Paralelamente, a variação na composição lipídica das micelas e a consequente alteração conformacional de OmpF, permitiu um melhor entendimento da interação da GP, que só neste meio micelar evidencia interagir com a proteína em localização semelhante à demonstrada pela MX.

Adicionalmente, os diferentes padrões de alteração à extinção de fluorescência pela acrilamida em presença da GP e da MX, decorrentes da variação da composição lipídica da estrutura de inserção, confirmam a existência de rearranjos conformacionais da estrutura

proteica perante as variações à estrutura de inserção, pois as alterações ocorridas em meio micelar de DMPG não se verificaram com a proteína inserida em meio micelar de DMPC.

Os estudos de interação de OmpF com as QNs, realizados com a proteína inserida em micelas mistas permitiram aceder a informações sobre as possíveis áreas de interação das quinolonas com esta proteína e sobre os possíveis rearranjos estruturais decorrentes dessa mesma interação. Paralelamente, a introdução de uma componente lipídica de carga negativa permitiu tirar algumas elações sobre possíveis efeitos moduladores da carga de superfície membranar sobre a interação destes antibióticos com a porina.

3.1.3 Extinção de fluorescência de OmpF inserida em proteolipossomas, na presença das QNs

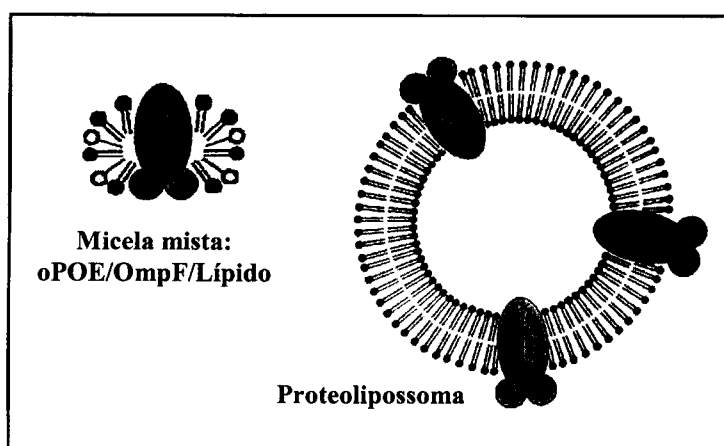


Figura III-27: Representação esquemática da diferente organização estrutural das estruturas de inserção de OmpF. Adaptado da referência [84].

A situação em que a proteína se encontra inserida em LUVs de DMPC (proteolipossomas) é a que mais se assemelha à situação *in vivo* e portanto é aquela que melhor se relaciona com o normal funcionamento de OmpF e com as possíveis interações desta proteína com os antibióticos em estudo.

Note-se que nos estudos anteriores, em que se recorreu a sistemas mais simples e de mais fácil manipulação, foi possível inferir sobre os eventuais locais de interação das QNs com OmpF, que agora com recurso a um sistema mais próximo da realidade se pretendem melhor esclarecidos. Adicionalmente, os proteolipossomas apresentam um compartimento aquoso interno (Figura III-27) que torna possível a acomodação de moléculas de fármaco no interior da vesícula que, para além de reproduzir melhor a situação real, permite ainda

que a interação entre o antibiótico e a proteína aconteça em toda a sua extensão, isto é, desde a aproximação à superfície externa da proteína (no exterior da vesícula) até um possível contacto com o lado interno.

Assim, a utilização dos proteolipossomas permitirá obter a confirmação da zona de interação dos diferentes antibióticos com a proteína, porém, o modo como esta interação se desenvolve e as alterações conformacionais daí resultantes serão naturalmente distintas daquelas verificadas nos estudos com micelas mistas (Tabelas III-13 e 14) já que a organização estrutural da proteína e consequentemente a sua interação com as QNs assume novos contornos.

	Sem fármaco		AN		CP		GP		MX	
	K_a (M^{-1})	f_a	K_a (M^{-1})	f_a	K_a (M^{-1})	f_a	K_a (M^{-1})	f_a	K_a (M^{-1})	f_a
Acrilamida	8,8 ($\pm 0,2$)	0,5 ($\pm 0,1$)	8,0 ($\pm 0,4$)	0,5 ($\pm 0,1$)	6,8 ($\pm 0,4$)	0,5 ($\pm 0,1$)	5,1 ($\pm 0,6$)	0,5 ($\pm 0,1$)	5,3 ($\pm 0,4$)	0,5 ($\pm 0,1$)
Iodeto	6,4 ($\pm 0,4$)	0,3 ($\pm 0,1$)	10,4 ($\pm 0,3$)	0,3 ($\pm 0,1$)	15,5 ($\pm 0,2$)	0,3 ($\pm 0,1$)	17,0 ($\pm 0,6$)	0,4 ($\pm 0,1$)	17,3 ($\pm 0,2$)	0,4 ($\pm 0,1$)

Tabela III-14: Constantes de Stern-Volmer e respectivas frações de fluorescência acessíveis, da extinção de fluorescência pela acrilamida e pelo iodeto aos Trp de OmpF inserida em LUVs de DMPC. A coluna da esquerda descreve o agente de extinção usado. As concentrações de antibiótico usadas foram (μM): 26,6 (AN), 26,9 (CP), 27,9 (GP) e 27,9 (MX). Os valores expostos correspondem à média e desvio padrão de pelo menos três ensaios independentes.

Os resultados obtidos para a extinção da fluorescência de OmpF, inserida em lipossomas de DMPC, pela acrilamida, revelam uma vez mais uma ausência de alteração significativa em presença do AN, notando-se um decréscimo nos valores de K_a em presença dos restantes antibióticos em estudo, decréscimo que se manifesta com maior intensidade para o caso da GP e da MX (Tabela III-14). Deste resultado mais uma vez se confirma a distinção nos locais de interação do AN e das restantes quinolonas estudadas, com a CP, GP e MX a provocarem alterações à extinção de fluorescência pela acrilamida, demonstrando assim uma zona de interação na proximidade do Trp⁶¹, com consequente redução na eficiência de extinção de fluorescência pela acrilamida por possível indução de alterações conformacionais.

Na extinção de fluorescência pelo iodeto, a tendência de comportamento perante as diferentes quinolonas surge alterada relativamente aos resultados observados com a proteína inserida em micelas mistas de DMPC, verificando-se um aumento de K_a não só

para a MX, como também para a CP e GP, e mesmo o AN, cuja presença causava um decréscimo de K_a nos estudos anteriores, induz agora um claro aumento ao valor desta constante. No caso do AN uma possível explicação para o seu efeito poderá relacionar-se com a sua interação com a fase lipídica, que na situação do meio micelar em consequência da reduzida área disponível para esta interação resultava forçosamente em alterações à eficiência de extinção de fluorescência por bloqueio estérico, efeito menos evidente na situação de proteolipossomas já que a interação com a bicamada lipídica pode desenvolver-se em áreas mais afastadas da interface com a proteína, daí resultando uma prevalência do efeito de destabilização estrutural que consequentemente facilita o acesso do iodeto ao Trp²¹⁴. Relativamente à presença das restantes quinolonas, os resultados obtidos com os estudos em proteolipossomas evidenciam uma vez mais a ocorrência de alterações conformacionais, pois dada a ordem de grandeza da variação imposta a K_a uma justificação com base numa interação ao nível da bicamada só se mostraria válida se as constantes de partição destes fármacos em lipossomas de DMPC apresentassem valores elevados, o que na realidade não se verifica^(11, 15). Salienta-se que no caso da CP e da GP a sua presença só introduziu alteração significativa à extinção de fluorescência pelo iodeto nos estudos com proteolipossomas, o que realça a importância da utilização deste tipo de estrutura que ao permitir que a interação entre fármaco e canal proteico se possa desenvolver em toda a extensão da superfície proteica faculta um maior esclarecimento das zonas de interação para os diferentes antibióticos. Adicionalmente, o caso concreto da interação da MX com OmpF, que nos estudos com micelas mistas se destacava por produzir alterações de maior intensidade que sugeriam um tipo de interação distinto, adquire agora esclarecimento adicional ao demonstrar comportamento idêntico ao da CP e GP, fazendo antever uma afinidade intrínseca pela proteína de intensidade semelhante para cada um destes três fármacos e justificando as diferenças anteriormente verificadas através de uma provável diferenciação no local de interação, que para a MX se evidencia a um nível mais externo.

3.1.4 Conclusões

Da totalidade dos resultados obtidos tornou-se evidente que as quatro quinolonas estudadas apresentam comportamentos distintos quanto à interação com OmpF. Este antibióticos evidenciam uma afinidade diferenciada para aos diferentes locais de interação com a proteína, com o AN a interagir em zonas próximas ao ambiente em que se localiza o

Trp²¹⁴ (interface lípido/proteína), e a CP, GP e MX a evidenciarem uma interação ao nível do interior do canal hidrofílico e portanto na proximidade do Trp⁶¹.

O tipo de interação desenvolvido por cada uma destas quinolonas com OmpF e a sua importância relativa para a entrada destes fármacos na célula bacteriana, constituem também importantes elações a extrair dos resultados obtidos. Assim, relativamente à interação desenvolvida pelo AN, a ausência de evidências a apontar para alterações conformacionais e a zona de interação deste antibiótico com OmpF, associados com a sua elevada hidrofobicidade^(16, 227) sugerem que a interação deste antibiótico com a proteína acontece num contexto de permeação membranar com aproveitamento da interface lípido/proteína e sem qualquer necessidade de passagem através do canal hidrofílico para a entrada do AN na célula bacteriana. Paralelamente, estudos microbiológicos envolvendo estirpes bacterianas mutantes quanto à expressão de porinas na sua membrana externa, revelam aumentos elevados nos valores das MIC deste antibiótico, perante a ausência de OmpF na membrana externa destas bactérias⁽¹⁶⁾, o que sugere que a permeação membranar deste antibiótico ocorre predominantemente por difusão através da bicamada, sendo esta difusão favorecida pela presença das porinas apenas por aproveitamento da interface lípido/proteína.

Relativamente à CP, GP e MX, as alterações conformacionais deduzidas ao longo deste estudo, são sugestivas de uma interação envolvendo uma ligação efectiva do fármaco à zona proteica que constitui o poro hidrofílico, com a MX a apresentar ligeiras variações ao padrão geral de comportamento, justificáveis ou por uma preferência por áreas do canal com localização mais periférica ou simplesmente evidenciando uma maior necessidade de rearranjo estrutural da proteína para se adaptar à sua passagem. Estas deduções são corroboradas não só pelo carácter mais hidrofílico destes fármacos^(15, 227), como pela sua reduzida partição em vesículas de DMPC^(11, 292), mas também por numerosos estudos microbiológicos que apontam para uma redução da eficiência antibacteriana das quinolonas mais recentes perante a diminuição ou mesmo ausência de porinas na membrana externa das bactérias^(15, 16, 219, 220, 293).

Salienta-se ainda a importância da inclusão de lípidos carregados negativamente na estrutura de inserção não só como forma de esclarecer a importância do efeito da atracção electrostática na interação das diferentes quinolonas estudadas, mas também como forma de melhor se perceber o efeito modulador das características da superfície membranar sobre a estrutura proteica, de onde advêm consequências óbvias ao nível da interação dos fármacos com a proteína.

Por último, salienta-se a utilidade deste tipo de estudo em que a conjugação das diferentes características de acessibilidade dos agentes de extinção e dos diferentes ambientes em que se inserem os triptofanos, com o efeito de modulação estrutural resultante da inserção da proteína em diferentes estruturas, tornou possível obter informações quanto a possíveis locais e extensão de interação das quinolonas com OmpF, provando a validade deste tipo de metodologia no esclarecimento de interações proteicas com possíveis ligandos.

3.2 Constantes de associação quinolona/OmpF

A porina OmpF constitui um canal dinâmico, no qual os resíduos carregados demonstram um efeito modulador sobre o fluxo de solutos que permeiam o canal (170,294,295). Apesar de numerosas moléculas recorrerem a OmpF para transporem a membrana externa, não existe um padrão de interação comum a todas elas, existindo diferenças não só nos locais de ligação como também no grau de afinidade e eficiência com que a interação se desenvolve (296).

O estudo detalhado de cada uma destas interações é essencial para se perceber a funcionalidade destes canais proteicos, mas assume particular importância sob o ponto de vista farmacológico como forma de melhor se perceber a permeação dos antibióticos e assim se ultrapassarem alguns dos frequentes problemas de resistência bacteriana.

O conceito básico inerente à associação de um composto a uma estrutura proteica reside na complementaridade entre composto e local de interação. Esta complementaridade manifesta-se principalmente a dois níveis: complementaridade estérica ou estrutural, isto é, adaptação da estrutura do composto à zona de associação com a proteína; e complementaridade físico-química, que permita o desenvolvimento de interações entre composto e proteína. Obviamente, que o estabelecimento de algumas destas interações desencadeia alterações na proteína, daqui resultando variação de algumas das suas propriedades, o que permite a quantificação da intensidade de tais interações.

No caso concreto da interação de OmpF com as quinolonas, a determinação das constantes de associação (K_{PQ}) foi efectuada a partir de variações nas propriedades espectroscópicas da proteína. A constante de associação constitui uma indicação directa da afinidade do ligando pela proteína, sendo no caso da interação das quinolonas com OmpF um valor indicador da importância desta proteína para a permeação destes antibióticos nas

bactérias de Gram (-) e um indicador das características estruturais destes fármacos com maior importância para a interação com a porina.

3.2.1 Meio micelar de oPOE

A primeira abordagem à quantificação da afinidade de cada uma das quinolonas em estudo pela porina OmpF foi efectuada com a porina inserida em meio micelar de oPOE. O principal objectivo destes estudos foi obter uma escala de afinidade absoluta pela proteína, de forma a posteriormente se poder avaliar a importância quer da componente proteica, quer da componente lipídica para a entrada destes antibióticos na célula bacteriana.

A quantificação da afinidade dos fármacos em estudo por OmpF, em meio micelar de oPOE, foi efectuada através da determinação de constantes de associação, tendo-se recorrido nestes estudos à espectroscopia de UV-Vis.

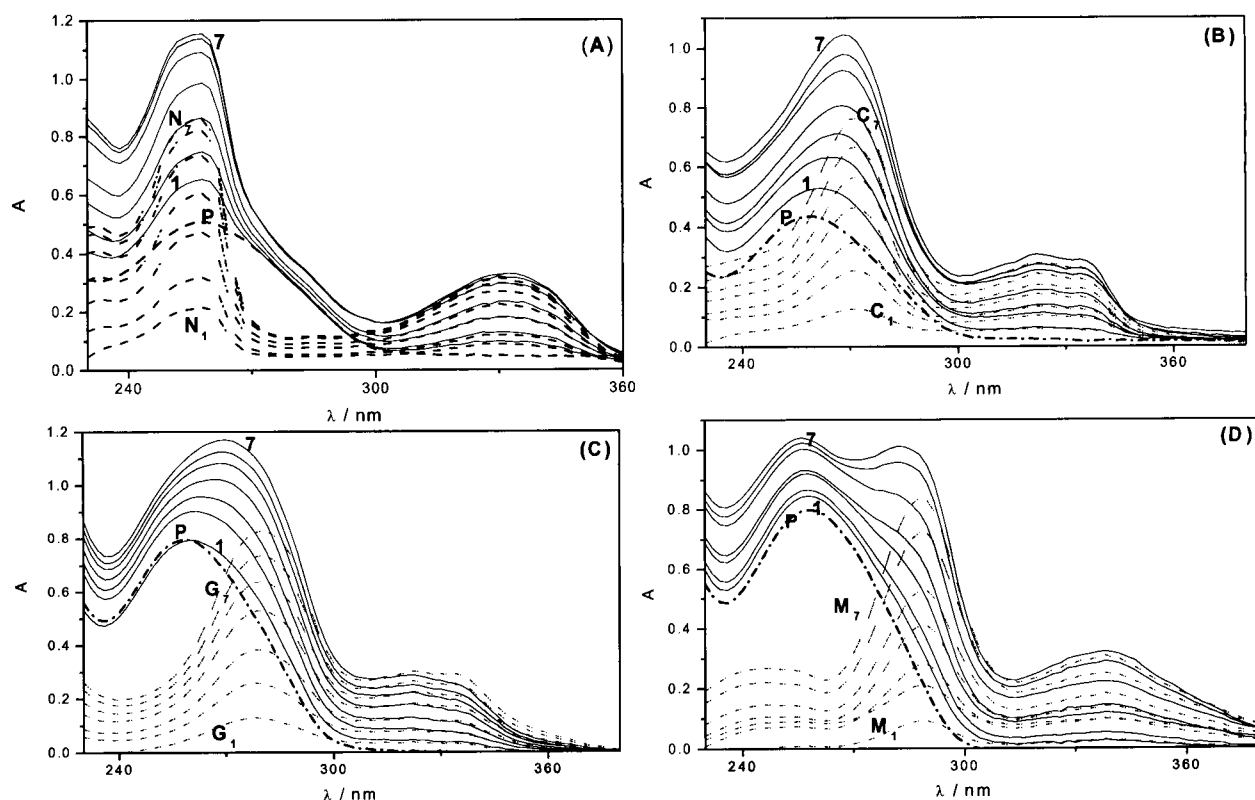


Figura III-28: Espectros UV-Vis de OmpF ($\sim 2,6 \mu\text{M}$) na ausência (P) e em presença de concentrações crescentes (1 $\rightarrow$ 7) das quinolonas estudadas. Os espectros representados a tracejado correspondem ao espectro da QN na concentração correspondente mas na ausência de proteína. (A) Ácido nalidíxico (μM): (1) 12,2; (2) 18,4; (3) 26,2; (4) 36,7; (5) 45,9; (6) 52,0; (7) 55,1; (B) Ciprofloxacina (μM): (1) 5,0; (2) 10,0; (3) 14,9; (4) 19,9; (5) 24,9; (6) 29,9; (7) 34,8; (C) Grepafloxacina (μM): (1) 5,6; (2) 10,4; (3) 15,2; (4) 21,7; (5) 26,1; (6) 30,4; (7) 34,8; (D) Moxifloxacina (μM): (1) 4,8; (2) 7,2; (3) 10,7; (4) 17,9; (5) 20,3; (6) 23,8; (7) 35,8.

Na figura III-28 encontram-se representados os espectros de UV-Vis de OmpF na ausência e em presença de quantidades crescentes dos fármacos estudados. Os intervalos de concentração de fármaco utilizados foram escolhidos de acordo com a lei de Lambert-Beer de cada um dos fármacos.

A adição de quantidade crescente de quinolona a quantidade constante de OmpF provoca um aumento da intensidade de absorção na zona espectral da proteína. Dentro dos intervalos de concentração de antibiótico experimentalmente possíveis, não se verificaram desvios espectrais significativos.

A variação da absorvância da proteína em função da concentração de antibiótico adicionado constituiu a base para a determinação das constantes de ligação.

Existem várias expressões gerais para a caracterização de uma possível isotérmica de ligação, sendo apropriado começar por testar o mais simples desses modelos que descreve a formação de um complexo proteína/substrato na proporção 1:1^(150, 152). Assim, os valores de absorvância obtidos experimentalmente foram sujeitos a um ajuste não linear à equação (9.8), expressão matemática que traduz a isotérmica de ligação para um modelo com formação de complexo proteína:fármaco na proporção 1:1⁽¹⁵⁰⁾ (Figura III-29A). Como forma de comprovar a aplicabilidade do modelo 1:1 e de se obterem estimativas para o valor da constante de ligação que permitissem uma correcta iniciação do ajuste não linear, a primeira abordagem ao tratamento dos resultados experimentais consistiu numa linearização através da equação (9.9) normalmente, designada de equação dos recíprocos duplos⁽¹⁵⁰⁾ (Figura III-29B).

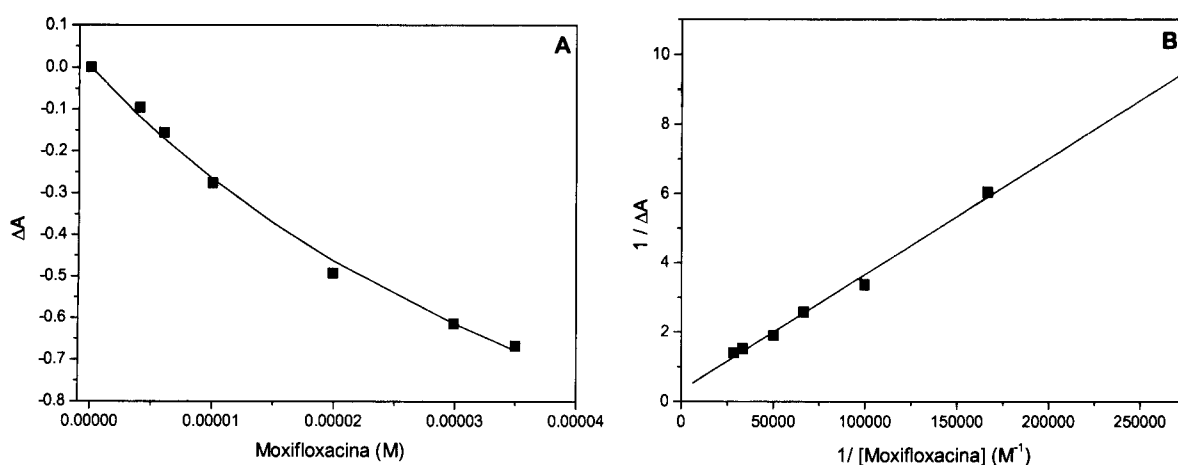


Figura III-29: Tratamento gráfico dos resultados experimentais obtidos para o sistema OmpF:MX, ao comprimento de onda de 278 nm. (A) Ajuste não linear, através do programa Origin 6.1TM, à equação (9.8) e (B) Ajuste linear à equação dos recíprocos duplos (9.9)⁽¹⁵⁰⁾.

Tal como se pode verificar na Figura III-29, para o exemplo do sistema OmpF:MX, a equação de linearização dos recíprocos duplos é perfeitamente aplicável aos resultados experimentais, tendo-se obtido, para todos os ensaios efectuados e para todos os fármacos estudados, rectas com coeficientes de correlação linear (r) na ordem 0,998, confirmando-se assim a aplicabilidade do modelo 1:1. Paralelamente, os valores das constantes de associação obtidos por cada uma destas abordagens revelaram-se bastante semelhantes, o que é comum para sistemas em que o modelo de 1:1 é aplicável ⁽¹⁵⁰⁾.

A análise dos resultados foi efectuada aos comprimentos de onda em que a variação de absorvância se mostra mais acentuada e, paralelamente, a vários comprimentos de onda na vizinhança do $\lambda_{\text{máx}}$, isto como forma de avaliar a reprodutibilidade e precisão dos resultados obtidos.

Os métodos gráficos acima descritos fundamentam os valores obtidos num número limitado de comprimentos de onda, sendo que uma análise mais detalhada do processo, com vista à obtenção de resultados mais precisos, requer uma utilização massiva das absorvâncias em intervalos mais alargados de comprimentos de onda com a resolução simultânea do conjunto de equações que descreve o modelo proposto, daqui resultando as constantes de equilíbrio que melhor descrevem o sistema. Assim, os valores das constantes de associação obtidos pelos métodos gráficos foram posteriormente refinados por métodos de regressão não linear, com recurso ao programa HYPERQUAD ⁽²⁹⁷⁾.

Na Tabela III-15, encontram-se sumariados os resultados obtidos, por cada uma das abordagens acima descritas, para os quatro antibióticos estudados. Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão dos resultados obtidos num mínimo de três ensaios independentes.

Quinolona (QN)	log K _{AN}	log K _{CP}	log K _{GP}	log K _{MX}
Geração	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a
HYPERQUAD	4,04 ± 0,02	4,17 ± 0,03	4.24 ± 0,02	4.35 ± 0,03
Métodos Gráficos ^a	3,76 ± 0,39	3,85 ± 0,34	4,02 ± 0,20	4,27 ± 0,25

Tabela III-15: Valores das constantes de associação obtidas para a interação das quinolonas com OmpF. Os resultados correspondem à média de pelo menos três determinações independentes e os erros associados correspondem aos respectivos desvios padrão. a) Valores obtidos por ajuste à equação (9.8).

Os valores de constante de associação OmpF/QN obtidos pelas diferentes metodologias matemáticas mostram-se, a menos de erro de cálculo, concordantes, embora se denote uma precisão sempre superior na análise por HYPERQUAD.

As constantes de associação OmpF/QN evidenciam uma forte interação entre os antibióticos e a proteína, verificando-se um aumento na intensidade de interação no sentido: AN < CP < GP < MX. Este aumento na afinidade pela proteína coincide com a progressão das gerações, o que associado com a redução das MIC das fluoroquinolonas mais recentes ^(229, 230, 298, 299) torna viável a sugestão de que quanto maior a afinidade por OmpF, maior a facilidade de permeação da membrana externa e consequentemente maior eficiência antibacteriana.

Note-se que a afinidade avaliada neste estudo, tem em consideração apenas a componente membranar proteica, constituindo uma abordagem preliminar, bastante simplificada que pretende apenas avaliar a afinidade intrínseca de cada um dos fármacos pela proteína. Estes estudos iniciais foram posteriormente confirmados por espectroscopia de fluorescência ⁽¹⁴³⁾, em que se seguiu a variação da fluorescência intrínseca da proteína, tendo-se obtido valores idênticos a menos de erro experimental.

3.2.2 Meio micelar de oPOE/DMPC ou DMPG

Os resíduos de triptofano das proteínas são extremamente sensíveis a alterações do ambiente em que se inserem, assim, a interação de um ligando nessa área é susceptível de introduzir alterações estruturais que ao influenciarem o ambiente na proximidade dos triptofanos, resultam em alterações à emissão de fluorescência da proteína ^(39, 300).

A interação do ligando com a proteína pode resultar em aumento da intensidade de fluorescência, se o complexo formado é também fluorescente ou se as alterações conformacionais da proteína o proporcionarem; ou em diminuição da fluorescência por formação de complexo não fluorescente com consequente efeito de extinção de fluorescência.

Ao longo destes estudos de avaliação da interação das quinolonas com OmpF em meio micelar de oPOE/DMPC ou DMPG o efeito da presença de concentração crescente de antibiótico sobre a proteína foi relacionado com as variações à fluorescência intrínseca de OmpF, metodologia com evidentes vantagens relativamente a espectroscopia de UV-Vis já que esta apresenta acentuado efeito de dispersão de luz em presença do referido meio micelar.

Na Figura III-30 são apresentados os espectros de emissão de OmpF, inserida em meio micelar contendo DMPC, na ausência e em presença das diferentes quinolonas estudadas.

A adição de concentração crescente das diferentes quinolonas a quantidade constante de OmpF provocou um decréscimo na intensidade de fluorescência da proteína, sempre

acompanhado de desvios ao comprimento de onda de máxima emissão para comprimentos de onda inferiores. Este tipo de comportamento foi verificado para ambos os meios micelares estudados (oPOE/DMPC e oPOE/DMPG), embora se tenham notado ligeiras diferenças relativamente aos desvios espectrais observados (Tabela III-16).

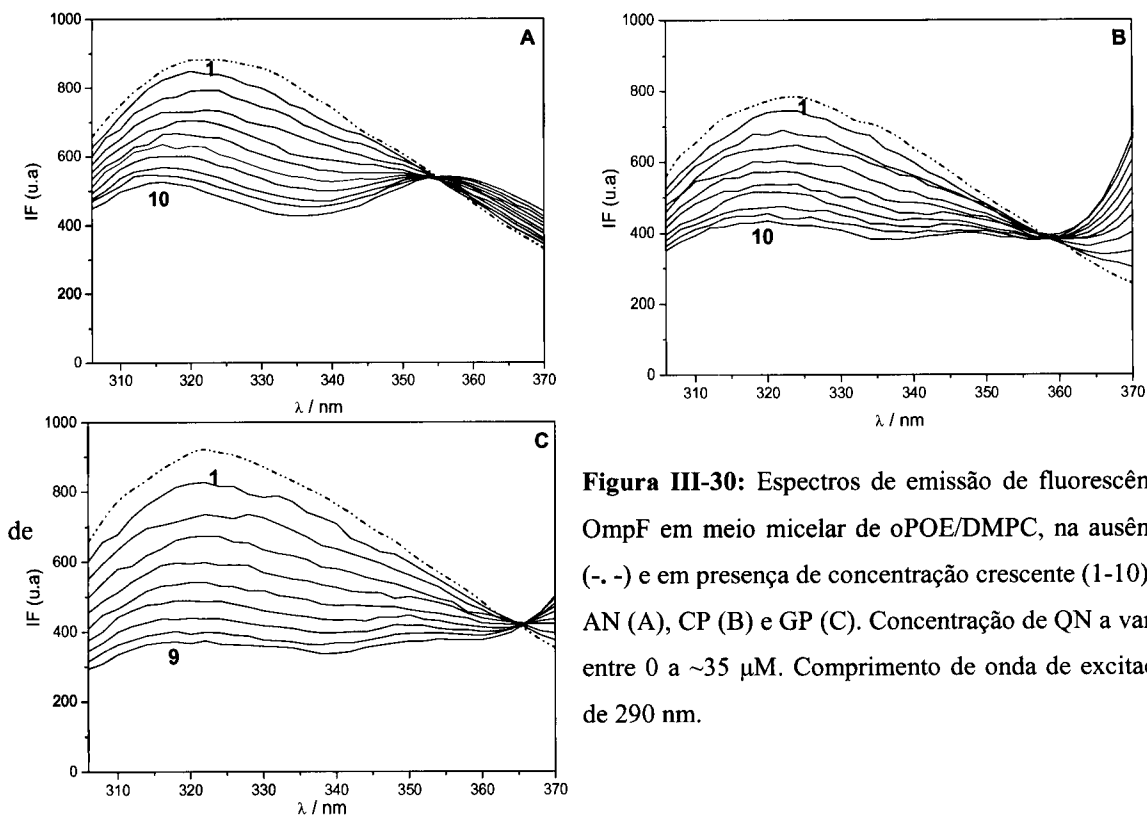


Figura III-30: Espectros de emissão de fluorescência OmpF em meio micelar de oPOE/DMPC, na ausência (-.-) e em presença de concentração crescente (1-10) de AN (A), CP (B) e GP (C). Concentração de QN a variar entre 0 a ~35 μ M. Comprimento de onda de excitação de 290 nm.

	DESVIO ESPECTRAL (nm)		
	AN	CP	GP
Mic.Mis. DMPC	8,0	4,0	4,0
Mic.Mis. DMPG	8,0	2,0	2,0

Tabela III-16: Desvios espectrais verificados por adição de quantidade crescente de QN a quantidade constante de OmpF inserida em diferentes meios micelares. A variação verificada manifestou-se para comprimentos de onda menores.

A presença de desvios espectrais no contexto de uma interação avaliada através da extinção de fluorescência é normalmente um indicador da ocorrência de interação entre o fluoróforo e o agente de extinção, fenómeno interpretado em termos de combinação de extinção dinâmica e estática. Adicionalmente, a prevalência da componente estática é

confirmada pela presença de desvios positivos à linearidade da relação de Stern-Volmer e pela obtenção de valores elevados de constante⁽³⁹⁾.

No caso concreto da interação de OmpF com as QN, dado o acesso diferenciado das diferentes QN aos ambientes em que se inserem os Trp da proteína, os desvios espectrais podem ainda associar-se com uma extinção de fluorescência selectiva relativamente ao Trp abrangido. Porém, para a mesma gama de concentrações de antibiótico foram notados desvios bastante mais acentuados para o AN, o que associado com as conclusões extraídas dos estudos de extinção de fluorescência com a acrilamida e o iodeto, vem uma vez mais realçar um comportamento distinto deste antibiótico no que respeita à interação com OmpF, destacando-se uma acentuação do desvio espectral para menores comprimentos de onda como consequência provável de um maior contributo do Trp⁶¹, que em resultado da extinção da fluorescência do Trp²¹⁴ por presença do AN, passa a contribuir em maior fracção para a fluorescência total emitida. Adicionalmente, note-se que as alterações à composição do meio micelar em que se insere a proteína, ao contrário do que aconteceu à CP e GP, não alteraram a intensidade do desvio espectral verificado com a presença do AN, o que constitui mais uma indicação de que a zona de interação do AN com OmpF é distinta daquela verificada para as restantes quinolonas estudadas.

Relativamente, aos desvios espectrais verificados em presença da CP e da GP, estes são com já se evidenciou bastante inferiores aos notados para o AN, ficando reduzidas a metade quando se tem a proteína inserida em meio micelar de oPOE/DMPG. Tal como já se evidenciou aquando dos estudos de extinção de fluorescência com a acrilamida e o iodeto, a proteína evidencia alteração estrutural da sua superfície não membranar como forma de evitar repulsões electrostáticas entre as cargas negativas abundantes nessa zona proteica⁽³³⁾ e as cargas negativas das cabeças polares do DMPG, daqui resultando variações ao acesso ao interior do canal hidrofílico fortemente influenciado pelas ansas externas, assim, confirma-se a interação destas QN ao nível do canal hidrofílico, supondo-se uma redução na afinidade ou uma menor necessidade de alteração conformacional na interação destes fármacos com a proteína quando esta se encontra inserida em meio micelar de oPOE/DMPG pois é nesta situação que se verifica menor desvio espectral.

Cálculo das constantes de associação. A variação da emissão de fluorescência de uma proteína, devidamente quantificada e ajustada às equações que descrevam reacções de associação ligando/proteína, permitem avaliar o grau de afinidade de um qualquer ligando pela proteína, através do cálculo de constantes de associação⁽³⁰¹⁾.

A constante de associação OmpF/QN, com a proteína inserida em micelas mistas, foi determinada aproveitando o decréscimo de fluorescência da proteína em presença de concentrações crescentes de cada um dos antibióticos. Uma vez que nos estudos prévios, com a proteína inserida em micelas de oPOE, se comprovou a validade do modelo de associação OmpF/QN de 1:1, nestes estudos manteve-se esta abordagem inicial tendo-se antecedido a análise quantitativa, por ajuste não linear da equação (9.11) à variação de emissão de fluorescência, de uma verificação da aplicabilidade do modelo através de linearização com a equação, normalmente, designada de equação dos recíprocos duplos (150).

Na Figura III-31 encontra-se representado um exemplo do tipo de gráfico resultante da variação à emissão de fluorescência da proteína por adição de concentração crescente de GP. A Figura III-31A constitui exemplo da linearização através de equação dos recíprocos duplos, na Figura III-31B exemplifica-se o ajuste não linear à equação representativa da isotérmica de ligação num modelo 1:1 (Capítulo I, item 4.3.2, equação 9.11) através das variações à emissão de fluorescência de OmpF.

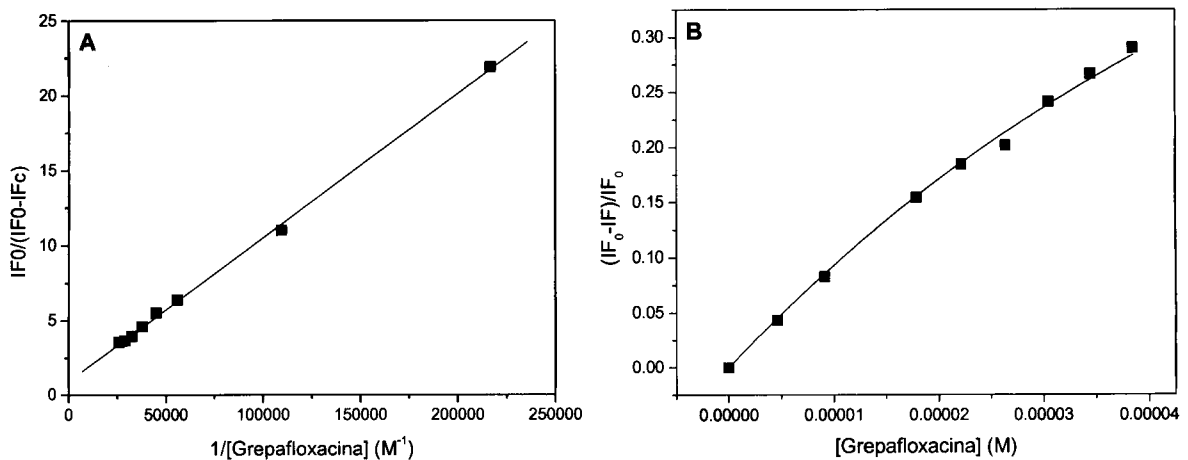


Figura III-31: Ajuste linear à equação dos recíprocos duplos (A) e ajuste não linear à isotérmica de ligação de um modelo 1:1 (B), da variação à emissão de fluorescência de OmpF (0,40 μ M) em presença de concentrações crescentes de GP (0-35 μ M). Comprimentos de onda de excitação de 290 nm e análise efectuada ao comprimento de onda de emissão de 324 nm.

Os valores das constantes de associação entre as quinolonas e OmpF, inserida em meio micelar de oPOE/DMPC ou DMPG, estão reunidos na Tabela III-17. Os valores apresentados correspondem à média e respectivo desvio padrão de pelo menos três ensaios independentes. Como forma de simplificar a comparação com os resultados obtidos em meio micelar de oPOE, apresenta-se também um resumo dos resultados obtidos nesse estudo.

	Àc. Nalidíxico	Ciprofloxacina	Grepafloxacina
	log K	log K	log K
Mic. oPOE	3,76 ± 0,39	3,85 ± 0,34	4,02 ± 0,20
Mic. Mis. oPOE/DMPC	3,98 ± 0,04	4,22 ± 0,07	4,40 ± 0,09
Mic. Mis. oPOE/DMPG	4,09 ± 0,05	4,26 ± 0,07	4,30 ± 0,07

Tabela III-17: Valores obtidos para as constantes de associação OmpF/QN. Resumo de resultados obtidos para os diferentes meios micelares de inserção de OmpF, e através de ajuste não linear da equação 9.11 aos valores experimentais obtidos.

Dos resultados sumariados na tabela acima confirma-se a tendência do aumento da afinidade pela proteína à medida que se progride para quinolonas de gerações mais recentes e caracteristicamente mais hidrofílicas ⁽⁸⁾.

Paralelamente, a presença da componente lipídica introduz um acréscimo nos valores das constantes, nitidamente mais acentuado para a CP e GP. A variação da componente lipídica não provoca qualquer alteração aos valores da constante de associação com a ciprofloxacina, mas introduz alterações aos valores obtidos para o AN e para a GP.

Mais uma vez, os diferentes comportamentos manifestados pelas quinolonas estudadas fazem antever diferentes locais de interação com a proteína. Adicionalmente, torna-se evidente a importância da componente lipídica no desenvolvimento da interação com a proteína, o que torna viável a possibilidade levantada, perante a localização membranar das quinolonas em estudos com lipossomas, da existência de uma primeira fase de partição do fármaco na bicamada que ao aproximá-lo da proteína promove o desenvolvimento da interação. O modo como essa interação se desenvolve após esta fase inicial é que se evidencia distinto pois as alterações impostas à proteína pela variação das características da componente lipídica tem efeitos distintos sobre as diferentes quinolonas. Para o AN a presença do DMPG, relativamente a um sistema com DMPC, produz um aumento ao valor da constante o que se torna lógico se conjugarmos a possibilidade da interação deste fármaco ao nível da interface lípido/ proteína com as suas características de predominância de íão negativo a pH 7,4 (pK_a do AN é de 6,41 ⁽⁸⁾) com consequente repulsão na interface lipídica que favorece a uma permeação com recurso à interface lípido/proteína. No caso da GP a introdução de uma componente lipídica carregada negativamente causa uma diminuição ao valor da constante, o que poderá relacionar-se com um possível deslocamento de parte do fármaco para a fase lipídica pois a pH 7,4 a GP apresenta 20% das suas moléculas na forma catiónica, ou muito simplesmente a alteração conformacional de OmpF pode dificultar-lhe o acesso ao seu local de interação.

3.2.3 Conclusões

A quantificação da interação de OmpF com as QN traduzida pelos valores de constantes de associação obtidas ao longo destes estudos revelou uma afinidade intrínseca destes fármacos por OmpF, evidenciando uma intensificação dessa afinidade para as fluoroquinolonas das gerações mais recentes. A associação destes resultados com estudos microbiológicos, que evidenciam uma maior potência antibacteriana para as fluoroquinolonas mais recentes, permite supor que uma possível permeação através de OmpF proporciona um acesso facilitado do antibiótico ao seu alvo de acção e assim um melhoramento na sua actividade antibacteriana.

Paralelamente, a introdução da componente fosfolipídica nas estruturas de inserção da proteína utilizadas nestes estudos, permitiu confirmar a ideia de que a transposição da membrana externa pelas QN envolve uma fase inicial de partição na componente lipídica que de algum modo promove a interacção destes antibióticos com a proteína, já que a presença da componente lipídica introduz um aumento nos valores das constantes de associação da proteína com qualquer uma das QN. Adicionalmente, a modulação da estrutura proteica em presença de uma componente lipídica com carga efectiva negativa vem mais uma vez evidenciar diferenças nas áreas de interacção de cada uma das QN com OmpF, afectando principalmente as quinolonas cuja interacção se desenvolve ao nível do canal hidrofílico pois são principalmente as ansas proteicas externas, que perfazem a periferia deste canal, que face à sua relativa abundância em cargas negativas são sujeitas a maior alteração com consequente modificação do acesso ao canal hidrofílico.

Por outro lado, os últimos resultados relativos à interacção de QN das últimas gerações (GP e MX ⁽¹¹⁾) com lipossomas, utilizados como modelos miméticos da componente lipídica, apresentam valores de constantes de partição bastante similares, que conjugados com a intensificação da afinidade por OmpF e a diferenciação de comportamento relativamente a membros de gerações mais antigas, faz realçar a ideia de que para as QN mais recentes a permeação da membrana externa das bactérias de Gram (-) se faz preferencialmente por via hidrofílica, isto é, através de canais porínicos. Este tipo de conclusão vem em completa conformidade com resultados de estudos envolvendo a interacção de OmpF com os antibióticos β -lactâmicos ^(302, 303), a partir dos quais se extraiu a conclusão geral de que uma maior eficiência de permeação através desta porina ocorria para os antibióticos que a pH 7,4 se apresentassem sob a forma de ião dipolar, verificando-se uma acentuada diminuição da velocidade de difusão através do canal para as formas carregadas negativamente. Assim sendo, e face aos valores das constantes de acidez das

QN estudadas (Tabela I-1) facilmente se confirma que o local de interação da CP, GP e MX seja efectivamente ao nível do canal hidrofílico enquanto que o AN pelas suas características de anião a pH 7,4 interaccue fundamentalmente ao nível da interface lípido/proteína.

As diferenças na afinidade destes fármacos pela componente membranar lipídica ou proteica constituem informação essencial para uma melhor percepção da farmacocinética das QN e assim um futuro melhoramento das suas características por alteração molecular.

3.3 Constantes de ligação a partir de determinações de RET entre a OmpF e a fluoroquinolona Ciprofloxacina

Da análise dos resultados expostos até ao momento, denota-se uma constante ambiguidade de comportamento relativamente à fluoroquinolona ciprofloxacina. Ou seja, os valores numéricos obtidos para esta QN, quando comparados com aqueles obtidos para as QN de comportamento mais distinto, AN e MX, apontam normalmente para a existência de uma interação com a proteína ao nível do canal hidrofílico, contudo esta tendência nunca se traduziu em valores numéricos tão evidentes como os verificados para a grepafloxacina ou para a moxifloxacina. Assim, na tentativa de melhor definir a sua interação com OmpF, recorreu-se a uma análise de RET como metodologia alternativa.

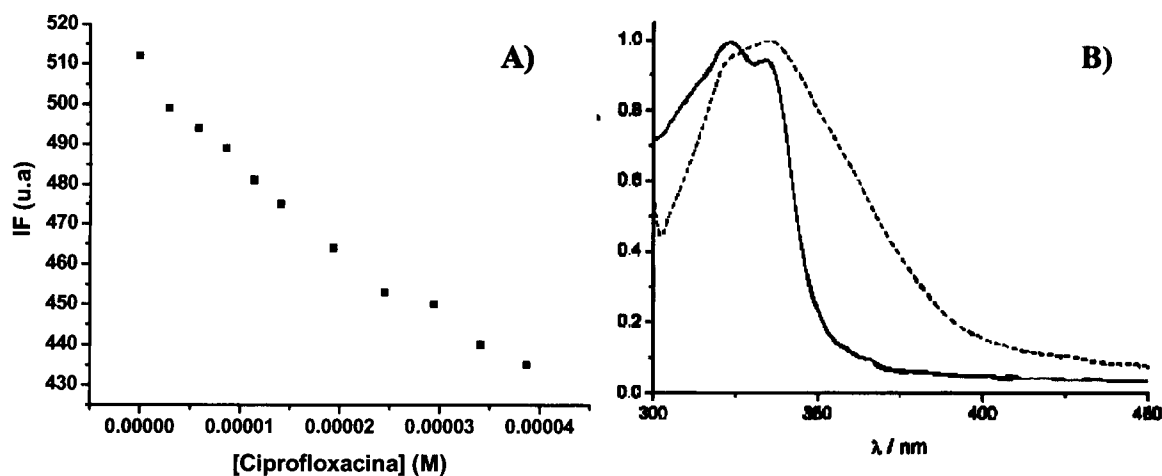


Figura III-32: Representações gráficas de: A) Decaimento da intensidade de fluorescência de OmpF por aumento da concentração de CP; e B) Sobreposição do espectro de fluorescência de OmpF (---), com o espectro de absorção da CP (—).

A análise da extinção de fluorescência de OmpF, através de um fenómeno de RET, reveste-se de alguma complexidade, devido às diferentes posições que os seus Trp assumem e à consequente existência de duas populações distintas de aceitadores. Desta complexidade de contributos para a fluorescência total, resultam formalismos de RET

específicos à situação em análise, de acordo com o exposto anteriormente (Capítulo I, item 4.2.1.4).

As sucessivas adições de pequenos volumes de solução de CP a uma solução contendo proteolipossomas de OmpF, resultou num decréscimo da fluorescência de OmpF (Figura III-32A), o que adicionado da sobreposição espectral verificada (Figura III-32B) e do valor de 23,3 Å para o raio de Förster (Capítulo I, item 4.2.1.4, expressão 6.2) permitiu confirmar a existência de um processo de transferência de energia de ressonância entre OmpF e a CP.

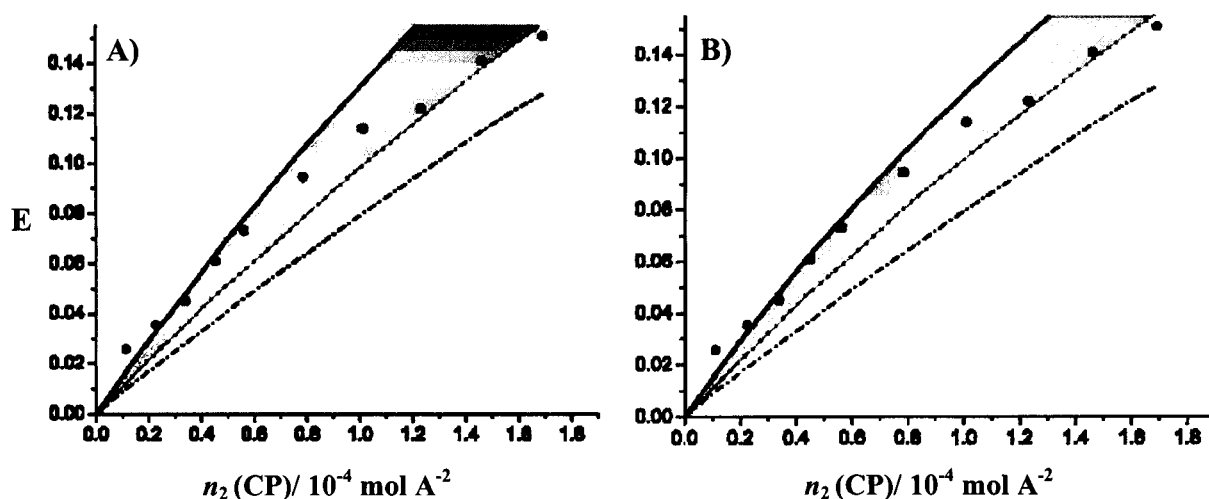


Figura III-33: Comparação das eficiências de transferência de energia teóricas e experimentais (●) para o par dador – aceitador: Trp de OmpF – CP, respectivamente. A simulação teórica que assume uma distribuição aleatória de aceptadores (não considerando a possibilidade de ligação) está representada por (---). A) Modelo I: Situação em que se assume a ligação da CP em zona próxima dos Trp⁶¹ ajuste dos dados experimentais às equações 6.8-6.14. B) Modelo II: Situação que assume a ligação da CP em zona próxima da periferia da proteína, e portanto na proximidade de um dos Trp²¹⁴. As simulações que permitem obter os limites superior e inferior do intervalo de K_{Lig} encontram-se representados, respectivamente, por (—) e (.....).

A aplicação das equações 6.4, 6.8 – 6.10, permite o cálculo da eficiência de transferência de energia teórica e consequentemente a sua comparação com os valores experimentais obtidos (Figura III-33). Assim, torna-se evidente que a acentuada extinção da fluorescência de OmpF verificada em presença da CP, não pode ser explicada apenas com base num fenómeno de transferência de energia de OmpF para uma população de aceptadores de CP livres em solução, mas antes requer a introdução de um contributo proveniente de uma fracção de CP especificamente associada à proteína. A quantificação do contributo da fracção de CP ligada a OmpF para o valor de RET total, passa pela

determinação da constante de ligação (K_{PC}) através do ajuste das equações 6.8 a 6.14 aos dados experimentais obtidos.

Dada a existência de duas populações distintas de dadores (Trp^{61} e Trp^{214}), a determinação da constante de ligação teve por base o estabelecimento de dois modelos distintos de acordo com o local de interação da CP com OmpF, tendo-se obtido valores de constante de ligação diferentes consoante o modelo tido em consideração. No caso do modelo I, em que se assume a ligação da CP numa área próxima ao centro do trímero, a extinção de fluorescência é bastante eficiente pois o local de ligação considerado para o aceitador permite-lhe afectar a fluorescência dos três Trp^{61} . No caso do modelo II, o aceitador (CP) liga-se a OmpF em área próxima da periferia do canal, desta forma apenas um dos Trp^{214} poderá ser afectado, ficando os restantes cinco a contribuir para a fluorescência da proteína e consequentemente a eficiência de extinção de fluorescência é menor.

Os valores de K_{PC} obtidos para cada um dos modelos encontram-se sumariados na Tabela III-18:

	$\log(K_{PC})_{(\text{Limite inferior})}$	$\log(K_{PC})_{(\text{Limite superior})}$
Modelo I	3,15	3,62
Modelo II	3,58	4,00

Tabela III-18: Limites, superior e inferior, para os valores de K_{PC} , para cada um dos locais de ligação considerados em análise. Modelo I: Ligação da CP em zona próxima da interface dos trímeros. Modelo II: Ligação da CP na periferia do canal, na proximidade da interface OmpF/lípidos. Os limites superior e inferior correspondem, respectivamente, ao melhor ajuste à maior e à menor concentração de CP utilizada.

De acordo com os resultados obtidos por métodos espectroscópicos (Item 3.2.1, Tabela III-15) os valores de $\log(K_{PC})$ da CP estariam compreendidos entre $3,85 \pm 0,34$ ou $4,17 \pm 0,03$ consoante o método de análise dos resultados ⁽¹⁴³⁾. Esses valores apresentam maior concordância com os valores obtidos por RET assumindo o modelo II, isto é, assumindo que a CP tem local de ligação próximo da periferia do canal. Esta concordância de valores obtidos através de metodologias distintas aponta para uma interação da CP com OmpF com localização na zona periférica do canal.

3.3.1 Conclusões

O uso na clínica comum da fluoroquinolona de 3^a geração CP tem evidenciado o aparecimento de um elevado número de resistências nas mais diversas estirpes bacterianas. Parte dessas resistências prendem-se com dificuldades no acesso da QN ao seu alvo de acção. Alguns desses mecanismos bacterianos envolvem mutações ou mesmo inibição da expressão de algumas porinas aparentemente relacionadas com a permeação da CP na célula bacteriana. Neste contexto, o pleno conhecimento do modo como a CP permeia as membranas bacterianas reveste-se de elevada importância. Nos estudos de extinção de fluorescência anteriormente descritos (Capítulo III: item 3.1) esta QN revela um comportamento pouco claro relativamente às possíveis áreas de interacção com OmpF, não se identificando com o comportamento do AN (quer no que se refere à sua influência sobre a extinção de fluorescência dos agentes usados, quer no que respeita às suas características físico-químicas), nem tão pouco evidenciando resultados numéricos tão evidentes como os demonstrados pela GP ou pela MX. Assim, é numa perspectiva de melhor esclarecer o tipo de interacção estabelecido entre OmpF e a quinolona CP que se optou por analisar com maior detalhe o fenómeno de RET verificado.

Através da análise da transferência de energia entre CP e OmpF, confirmou a suspeita da existência de interacção específica entre OmpF e a quinolona CP, adicionalmente, tornou possível a sua quantificação através da determinação de uma constante de ligação, e facultou uma maior definição topográfica da zona em que se estabelece a interacção.

Por último resta salientar, que a metodologia implementada para o par OmpF/CP poderá encontrar aplicação na análise de RET para outros sistemas proteicos similares, tudo dependendo de um estudo detalhado das características do novo sistema e da aplicação das devidas adaptações relativamente às diferenças encontradas.

4. Alterações à Condutividade Eléctrica de OmpF em presença da Moxifloxacina e do Ácido Nalidíxico

Os estudos iniciais de partição e localização membranar da fluoroquinolona MX (Capítulo III, item 1.) revelaram uma distribuição membranar desta quinolona essencialmente periférica, tornando pouco provável a possibilidade deste antibiótico permear a membrana externa exclusivamente por difusão membranar. Paralelamente, os estudos de extinção de fluorescência com a acrilamida e o iodeto (Capítulo III, item 3.1) revelaram comportamentos distintos no que concerne a interacção de OmpF com o AN ou com a MX. Ou seja, enquanto que o AN evidencia uma interacção ao nível da interface lípido/proteína, a MX revela uma interacção ao nível do canal hidrofílico, dando indicação de uma possível ligação em zonas do interior do canal. Adicionalmente, a quantificação da interacção das QN com OmpF através das constantes de associação, permitiu estabelecer uma correlação entre a afinidade pela porina e as características estruturais e respectivo equilíbrio hidrolipofílico das QNs em estudo, tendo-se concluído que a potenciação da actividade antibacteriana, característica das QN mais recentes, estaria associada com um acesso facilitado ao interior bacteriano por passagem através do canal hidrofílico.

Assim, o principal objectivo dos estudos de condutividade eléctrica relaciona-se com uma melhor percepção do processo de transposição da membrana externa pelas QN através de uma determinação directa que confirme a permeação destas moléculas através do canal hidrofílico.

A proximidade entre as dimensões das moléculas de antibiótico e a zona de constrição do canal porínico permite associar períodos sistemáticos e mensuráveis de interrupção à corrente iónica através de OmpF, em presença de antibiótico, a bloqueios aleatórios do fluxo de iões por presença de moléculas de antibiótico no interior do canal hidrofílico. O tempo de permanência de determinada molécula no interior do canal pode ser obtido em função dos períodos de bloqueio à corrente iónica através do canal, e partindo desta informação torna-se possível o cálculo de constantes de equilíbrio e consequentemente a quantificação da interacção da QN com OmpF.

A selecção das quinolonas usadas nestes estudos, AN e MX, teve por base o acentuado contraste das suas propriedades (Capítulo I) e as diferenças de comportamento no que respeita às vias de transposição da membrana externa deduzidas dos diversos estudos apresentados na literatura e dos resultados obtidos nos estudos anteriores.

4.1 Intensidade de Corrente ao longo do tempo

A primeira abordagem à interacção das QN com OmpF, por condutimetria, foi efectuada com base numa análise às flutuações de corrente iónica através de OmpF induzidas pela presença de antibiótico.

Na figura III-34 C₁ e C₂ evidenciam-se as interrupções à pequena corrente iónica através dos canais hidrofílicos que constituem cada um dos monómeros de OmpF, quando em presença da MX. Como forma de comparação também um extracto do ruído de fundo (Figura III-34 A₁ e A₂) e um extracto do sinal obtido em presença do AN (Figura III-34 B₁ e B₂) são apresentados para as mesmas condições.

A observação dos traçados gráficos de condutância em função do tempo permite tirar algumas elações quanto aos efeitos da presença de cada um dos antibióticos, sendo notória a diferença na presença da MX, relativamente à presença do AN. Enquanto que em presença do AN o registo observado praticamente não se distingue daquele observado para o registo do ruído de fundo, em presença da MX verifica-se uma nítida intensificação das oscilações à condutância iónica (Figura III-34 C₁), e dado que a condutância iónica típica do trímero ronda os 900 pS (100 mM KCl, - 150 mV)⁽³⁴⁾, o comportamento observado na Figura III-34 C₂ é sugestivo de um bloqueio reversível de um dos canais hidrofílicos que constitui o trímero, fenómeno que foi observado inúmeras vezes aquando das determinações em presença da MX.

Uma vez que a porina OmpF tem uma inserção membranar estritamente ordenada e assimétrica^(192, 266), tornou-se pertinente verificar se a extremidade do canal com que o antibiótico é posto em contacto tem influência na interacção desenvolvida. Assim, fizeram-se determinações em que o antibiótico foi adicionado ao mesmo lado de adição da porina (lado *cis*), e outras em que se adicionou ao lado oposto (lado *trans*), não sendo detectável, neste tipo de análise, alterações significativas de perfil comportamental. Este tipo de observação, relativamente à interacção da MX com OmpF, permite antever uma capacidade do antibiótico para entrar no canal quer pela extremidade extracelular, quer pela extremidade periplásmica⁽¹⁹²⁾, porém, não dá qualquer indicação quantitativa da afinidade do antibiótico relativamente a cada uma destas extremidades da porina.

Por último, convém salientar que as conclusões extrapoladas directamente do tipo de traçado representado na Figura III-34 são sempre dotadas de alguma subjectividade consequência das flutuações inerentes ao sistema.

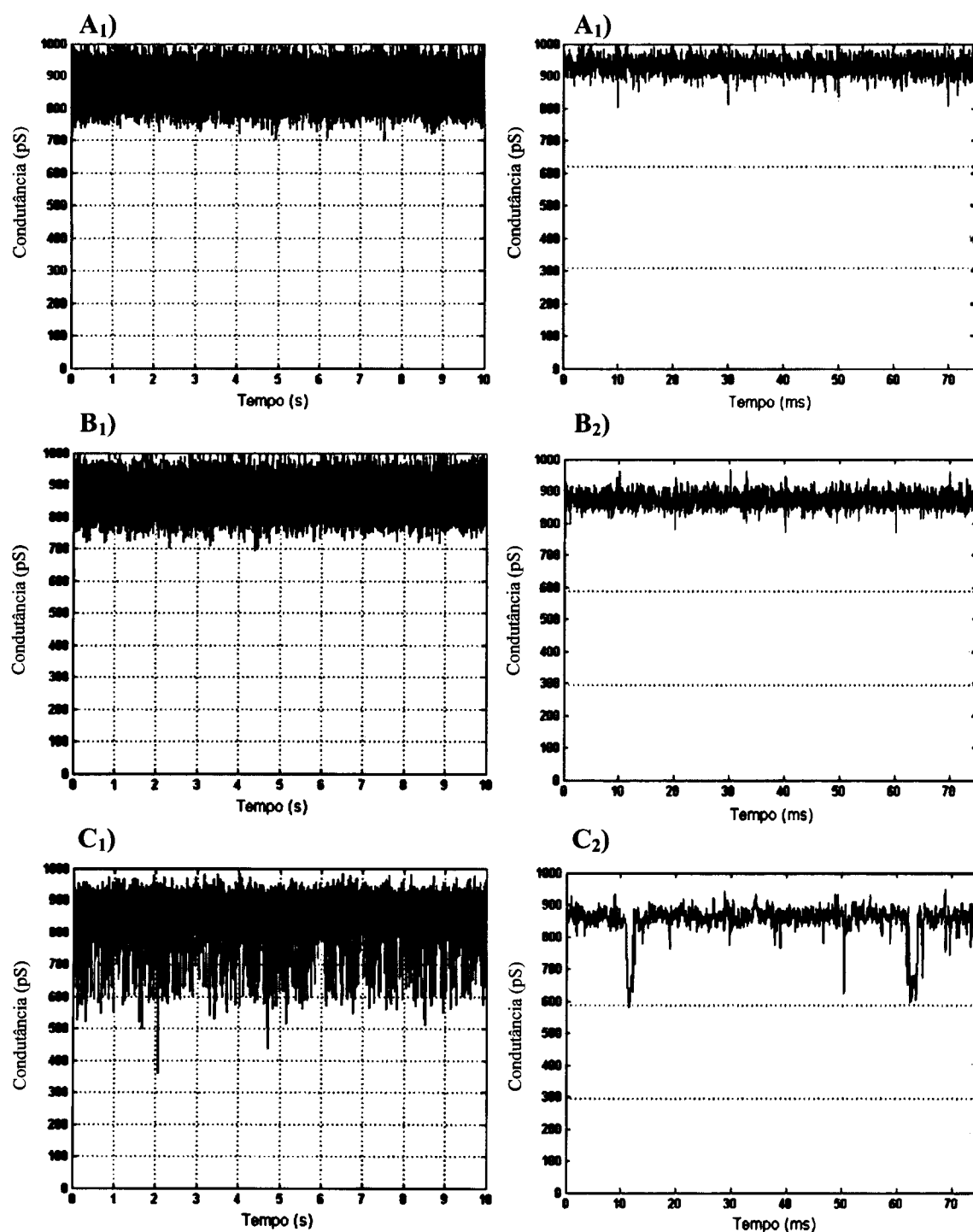


Figura III-34: Condutância iónica através de OmpF. A coluna de gráficos da direita (2) consiste numa ampliação de uma fracção de tempo dos traçados gráficos da esquerda (1). A) 150 mM KCl ; B) 150 mM KCl e 6,5 mM de Ácido Nalidíxico; C) 150 mM KCl e 6,5 mM de Moxifloxacina. A diferença de potencial aplicada nestas determinações foi de -150 mV.

4.2 Densidade espectral

Para maior conveniência e em prol de maior rigor, procedeu-se à análise temporal do registo de corrente eléctrica, tendo-se recorrido à transformada de Fourier que faz a conversão entre o domínio temporal e o domínio de frequência ⁽¹⁹⁵⁾. O aumento da

densidade espectral provocado pela ligação do antibiótico no interior do canal pode descrever-se através de uma curva Lorentziana ⁽³⁰⁴⁾, utilizando-se este ruído espectral na obtenção de parâmetros característicos da interacção, tais como constantes de ligação ^(196,305) (Capítulo I).

Na Figura III-35 apresentam-se os traçados típicos de densidade espectral, antes da subtracção do ruído de fundo do sistema, em presença de 5 mM de AN ou 5 mM de MX (adições ao lado *cis*).

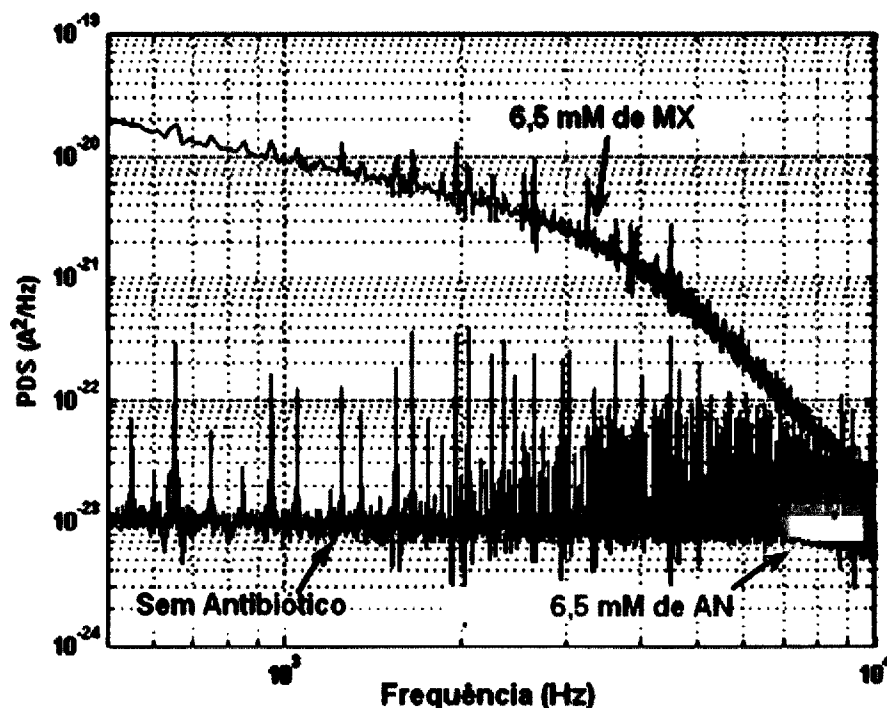


Figura III-35: Espectros de densidade espectral para determinações distintas. A curva (—) foi obtida em tampão contendo apenas 150 mM KCl; A curva (---) corresponde à adição de 6,5 mM de AN; A curva (···) corresponde à adição de 6,5 mM de MX.

O ajuste de uma função Lorentziana (Ver Capítulo I, equação 10.1) aos espectros obtidos permite extrair o valor da Frequência Angular (f_c), e a partir desta extrai-se a constante de tempo de relaxamento, isto é, o tempo característico de transporte através do canal (Capítulo I, equação 10.2).

Uma vez que o ruído de fundo do sistema difere bastante entre as várias determinações, todos os resultados foram tratados após subtracção do ruído de fundo da respectiva determinação, obtido por medição da condutância do sistema apenas em solução de tampão (Tris pH 7,4, 100 mM KCl) e imediatamente antes da adição dos antibióticos.

Neste tipo de traçado torna-se evidente que a presença do AN não induz alteração espectral detectável, verificando-se que a densidade espectral obtida em presença deste antibiótico se sobrepõe, dentro dos limites de erro inerentes à técnica, aquela obtida para o ruído de fundo. Assim, e uma vez que mesmo a frequências relativamente altas, próximas ou superiores a 10 kHz, não se detectam quaisquer variações, conclui-se que o tempo de permanência das moléculas de AN no canal porínico é na ordem da fracção de micro segundo, tornando-se assim improvável a hipótese de uma ligação deste antibiótico no interior do canal porínico.

Relativamente à MX, mesmo a baixas frequências, o aumento da densidade espectral induzido pela sua presença excede o ruído de fundo em cerca de duas ordens de magnitude, obtendo-se uma curva Lorentziana característica e directamente dependente da concentração de antibiótico, tal como se pode observar na Figura III-36.

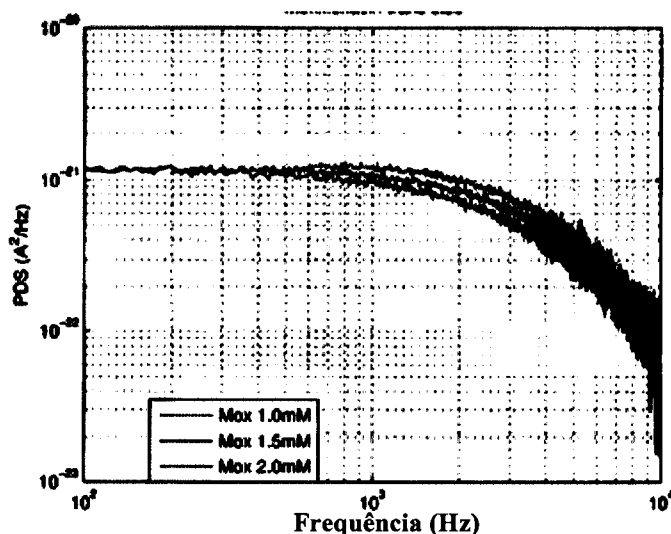


Figura III-36: Espectros de densidade espectral, após subtracção do ruído de fundo, de uma determinação envolvendo sucessivas adições de Moxifloxacina.

Na Figura III-37 apresenta-se a relação gráfica da dependência da Frequência Angular relativamente à concentração de moxifloxacina adicionada, dados obtidos de diferentes determinações com adições ao lado cis e ao lado trans. A referida dependência ajusta-se, com um bom índice de correlação, a uma relação linear, considerando-se que a diferença obtida, relativamente às adições ao lado “cis” ou ao lado “trans”, como praticamente desprezível face à margem de incerteza associada à determinação.

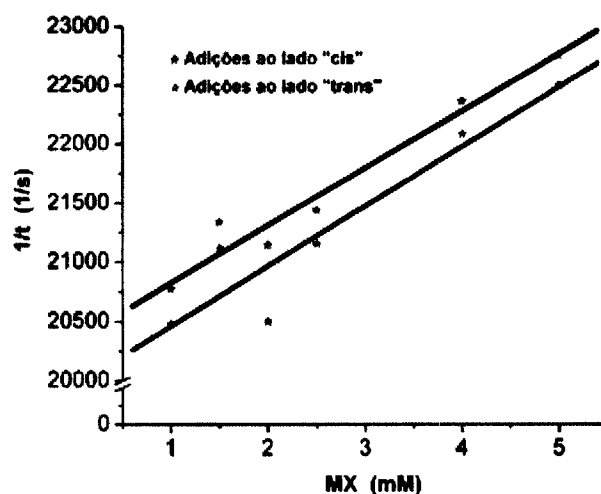


Figura III-37: Frequência Angular (f_c) obtida a partir dos espectros de densidade espectral para diferentes concentrações de MX, em adições ao lado “cis” e ao lado “trans”. Ajuste linear à equação (10.2), tendo-se obtido valores de k_{Lig} e k_{Diss} de $160000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ e 20000 s^{-1} , respectivamente.

Da análise do traçado gráfico da Figura III-37 obtém-se uma expressão da afinidade da MX pelo interior do canal porínico, quantificada sob a forma de constante de ligação de valor igual a 8 M^{-1} ($K = 8 \text{ M}^{-1}$) (Capítulo I, equação 10.2) e com valores para as constantes cinéticas de associação (k_{Ass}) / dissociação (k_{Dis}) de $160000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ e 20000 s^{-1} , respectivamente.

Paralelamente, o ajuste permite ainda obter o tempo de permanência da MX no interior da porina, tendo-se obtido um valor de tempo de residência (t_r) de $50 \mu\text{s}$ quer para adições ao lado cis quer ao lado trans. Note-se que na ausência de qualquer interacção entre canal e antibiótico a passagem através do canal molecular é governada por um processo de relaxação difusional, cujo tempo característico de permeação seria função de $L^2/12D$ ^(189, 190), com $L \sim 5 \text{ nm}$ a representar o comprimento do canal e $D \sim 3 \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ o coeficiente de difusão de uma partícula de alguns nanómetros, e portanto seria um processo bastante rápido com duração na ordem dos nanossegundos. Assim, este tempo de residência no interior do canal, quando se apresenta várias ordens de magnitude superior ao valor teórico para um processo de mera difusão molecular, constitui forte evidência da existência de interacção entre o canal e a molécula em estudo ⁽¹⁹¹⁾.

O valor obtido para o tempo de residência da MX no interior do canal hidrofílico de OmpF é inferior ao encontrado na literatura para os β -lactámicos ($\sim 120 \mu\text{s}$) ⁽¹⁹²⁾, porém, é considerado da mesma ordem de grandeza e portanto comparável quanto à intensidade da interacção de cada um dos grupos de antibacterianos com a porina.

Relativamente, à obtenção do mesmo tempo de residência da MX quer para as adições ao lado *cis*, quer para as adições ao lado *trans*, esta constatação sugere que a molécula de

antibiótico é capaz de entrar no canal quer pela extremidade extracelular, quer a partir da extremidade intracelular o que constitui indicação de que após a entrada da molécula de antibiótico no canal esta irá interagir com a estrutura proteica sempre no mesmo local⁽¹⁹²⁾.

4.3 Conclusões

O objectivo da realização dos estudos de condutividade eléctrica de OmpF visava a confirmação das teorias levantadas nos estudos anteriores relativamente às vias de permeação da membrana externa pelas diferentes QNs. Os estudos de extinção de fluorescência evidenciaram claramente diferenças quanto à via de permeação da membrana externa pelo AN relativamente às restantes quinolonas em estudo. Adicionalmente, em todos os estudos que visaram a quantificação da interacção da porina OmpF com as diferentes quinolonas, o AN apresentou sempre uma menor afinidade por OmpF que as restantes QNs. Estas constatações em relação às diferenças de comportamento do AN somadas com a sua maior hidrofobicidade e distintas propriedades ácido – base, levaram à formulação da teoria de que permearia a membrana externa bacteriana por via essencialmente hidrofóbica, eventualmente facilitada por utilização da interface lípido/porina, mas sem recurso da via hidrofílica que constitui o interior do canal. Como exemplo de QN com comportamento e características opostas, apresenta-se a MX, da qual se pressupõe uma permeação facilitada por recurso à via hidrofílica através do canal porínico.

Assim, tornou-se imprescindível utilizar um método directo, que provasse inequivocamente a presença do fármaco no interior do canal hidrofílico que constitui cada um dos monómeros de OmpF.

As interrupções à corrente iónica através de OmpF, causadas pela presença da MX e que se intensificam com o aumento da concentração deste antibiótico e revelando tempos de permanência no interior do canal na ordem dos microsegundos, constituem prova de ligação deste antibiótico ao interior do canal. Paralelamente, a ausência destes mesmos efeitos em presença do AN é sugestiva de inexistência de ligação do antibiótico no interior do canal hidrofílico.

Relativamente à interacção da MX com OmpF esta revela um local de interacção constante no interior do canal hidrofílico, pois quer o fármaco aceda ao interior do canal vindo do compartimento a que se associa o exterior bacteriano, quer o faça pelo lado oposto e portanto pela abertura associada ao espaço periplasmático, o seu comportamento e tempo de permanência no interior do canal revelam-se muito semelhantes.

Por último resta salientar que com recurso a este tipo de metodologia não só se confirmou diferentes vias de permeação da membrana externa para quinolonas com distintas características físico-químicas como paralelamente se evidenciou a existência de uma ligação efectiva da MX ao interior do canal hidrofílico o que associado ao conhecimento da estrutura do antibiótico e da proteína poderá constituir informação valiosa no desenvolvimento futuro de novas quinolonas.

CAPÍTULO IV: CONSIDERAÇÕES FINAIS

CAPÍTULO IV: CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao longo dos diversos itens desta dissertação foram sendo apresentadas as principais conclusões e, sempre que possível, foram estabelecidas as devidas comparações quer com o descrito na literatura, quer ainda com os resultados provenientes de outras metodologias. No presente capítulo irá proceder-se apenas a uma síntese das principais conclusões gerais a extrair do trabalho realizado, tentando-se transmitir uma visão integrada dos estudos efectuados e da sua utilidade para o esclarecimento das interacções estabelecidas pelos fármacos em estudo com os diferentes componentes membranares.

A permeação membranares das quinolonas é indiscutivelmente um passo essencial para o desenvolvimento da sua actividade antibacteriana. Assim, o objectivo central do trabalho realizado consistiu na investigação da importância relativa das diferentes vias de entrada na célula bacteriana pelas quinolonas, tendo-se dado especial relevo à via porínica por estar normalmente associada a um aumento da eficácia antibacteriana e a um alargamento dos espectros de acção.

Grande parte da informação disponível na literatura sobre a entrada de antibióticos na bactéria é proveniente de estudos microbiológicos. Estes representam um passo essencial ao estudo de qualquer molécula com actividade antibacteriana fornecendo importantes informações quer no que respeita aos factores que influenciam tal actividade quer ainda sobre as variáveis bacterianas que tornam a molécula ineficaz, contudo são estudos que por envolverem a totalidade da célula bacteriana carecem de especificidade falhando no que respeita ao pormenor da interacção a nível molecular.

O esclarecimento das diferentes componentes membranares envolvidas na entrada de um antibiótico na célula bacteriana passa assim, pela criação de modelos miméticos de biomembranas adequados à componente a ser avaliada. Nos estudos realizados foram utilizados três modelos membranares, o lipossoma, para a avaliação do contributo da componente membranares lipídica, o proteolipossoma e a bicamada fosfolipídica planar, para o estudo da interacção com uma das possíveis componentes membranares proteicas, a porina OmpF. A utilização dos proteolipossomas requereu o estabelecimento de uma

metodologia de reconstituição membranar de OmpF que se adequa-se aos estudos a realizar posteriormente, isto é, que permitisse a disposição da porina na sua conformação activa e com a orientação correcta ao sentido de permeação membranar de interesse, tendo-se seleccionado o procedimento de reconstituição, por inserção em lipossomas pré-preparados, em função destes dois principais critérios.

O primeiro passo para a obtenção de informação sobre as interacções estabelecidas entre fármacos e um qualquer ambiente membranar consiste na determinação da sua partição nesse mesmo ambiente. Assim, numa primeira fase os estudos realizados centraram-se na determinação de coeficientes de partição da fluoroquinolona moxifloxacina (valores inexistentes na literatura) entre uma fase aquosa (tampão Hepes) e uma fase lipídica constituída por lipossomas de DMPC e DMPG, as duas principais componentes lipídicas utilizadas nos estudos. Posteriormente, a diferenciação de uma interacção de superfície, de provável relação com um passo inicial de mera adsorção e orientação molecular, de uma capacidade intrínseca de difusão da bicamada, foi obtida através dos estudos de localização da MX na bicamada das vesículas lipossómicas.

A interacção da MX com os lipossomas revelou-se bastante semelhante aquela verificada para a GP (fluoroquinolona de 3.^a geração) embora de maior intensidade do que a verificada para outras quinolonas de gerações anteriores, facto associado às suas distintas propriedades ácido-base e ao incremento de hidrofobicidade introduzido na sua estrutura. Relativamente aos valores obtidos para cada um dos lípidos, o coeficiente de partição da MX nos lipossomas de DMPG é cerca de cinco vezes superior ao obtido para os lipossomas de DMPC, revelando uma prevalência, pelo menos inicial, de uma interacção electrostática. Os estudos de localização membranar apontam para um posicionamento do fármaco em zona essencialmente periférica, não ultrapassando a profundidade membranar do carbono 5, que contudo quando comparada com outras quinolonas revela a existência de um reforço da componente hidrofóbica na transposição membranar da MX. Este tipo de resultado, é sugestivo de um mecanismo de interacção com as bicamadas que passa forçosamente por uma fase inicial de adsorção electrostática à interface membranar, que poderá resultar numa destabilização estrutural desta região periférica facilitando o acesso do fármaco a áreas mais internas da bicamada fosfolipídica ou a outras estruturas membranares. Note-se que o desenrolar deste passo inicial de permeação membranar, tem como condição essencial uma atracção electrostática das moléculas de antibiótico à superfície membranar, esta atracção implica a existência de uma superfície de carga negativa, condição verificada para as bactérias de Gram (+), contudo, para as bactérias de

Gram (-) o passo inicial de destabilização membranar terá uma origem mais viável se fundamentado na destabilização do LPS por complexação dos catiões que mantêm esta estrutura estável.

No que se refere à interacção das quinolonas com OmpF, esta foi avaliada de acordo com dois principais objectivos:

- Avaliar a afinidade intrínseca de cada uma das quinolonas estudadas pela porina;
- Determinar a zona da proteína com a qual a quinolona interacciona de forma a melhor discernir entre uma permeação através do canal hidrofílico da porina, de uma permeação pela interface proteína/lípido com simples aproveitamento da destabilização membranar.

O primeiro destes objectivos foi explorado através da determinação de constantes de associação proteína-fármaco, tendo-se feito variar o tipo e composição da estrutura da inserção de forma a avaliar um possível efeito modulador da componente lipídica. Dos resultados obtidos nestes estudos confirmou-se a afinidade intrínseca das moléculas de quinolonas por OmpF, afinidade essa que se intensifica à medida que se progride nas gerações de quinolonas, isto é, há um aumento de afinidade por OmpF no sentido AN<CP<GP<MX que coincide com a evolução estrutural que foi dando origem às gerações mais recentes, caracterizadas por espectros de actividade mais alargados e maiores potências antibacterianas, daí se deduzindo uma relação directa entre a maior facilidade de permeação membranar e a melhoria das características antibacterianas. Esta escala de actividades manteve-se independente da composição da estrutura de inserção da proteína, contudo, a introdução de uma componente fosfolipídica induz um aumento nos valores das constantes de associação de todas as quinolonas o que confirma a ideia de que a transposição da membrana externa pelas quinolonas passa por uma fase inicial de interacção/partição com a componente lipídica.

Relativamente à definição topográfica da interacção estabelecida com OmpF, esta foi esclarecida recorrendo a três principais metodologias. A primeira abordagem recorreu à extinção da fluorescência de OmpF pelo iodeto e pela acrilamida na presença das quinolonas, tendo-se concluído com estes estudos que as diferentes quinolonas apresentavam afinidades para locais distintos da estrutura proteica, diferenciando-se dois comportamentos principais, aquele aqui representado pelo AN que manifestamente revelou uma interacção com OmpF ao nível da interface proteína/lípido; e o comportamento diferenciado das restantes quinolonas, CP, GP e MX, que demonstram claramente interagirem com OmpF ao nível do interior dos canais hidrofílicos. Destas quinolonas, a

MX é quem evidencia esta preferência de forma mais acentuada, tendo comportamento oposto ao do AN.

A localização do local de interacção das diferentes quinolonas com a estrutura proteica e a sua maior ou menor afinidade pela porina foram, posteriormente, confirmadas por metodologias alternativas. Relativamente à interacção da CP com OmpF, a zona estrutural da proteína envolvida nesta interacção foi averiguada através de estudos de RET, que permitiram a confirmação da existência de interacção específica entre OmpF e a CP, adicionalmente, tornaram possível a quantificação dessa afinidade através da determinação de uma constantes de ligação que se mostrou concordante com aquela obtida por métodos espectroscópicos, tendo ainda facultado uma maior definição topográfica da zona em que se estabelece a interacção, ao evidenciar uma localização em zona próxima do Trp²¹⁴, isto é, no interior do canal hidrofílico mas próxima da periferia do canal.

Através dos estudos de condutividade iónica de OmpF, fez-se uma comparação objectiva das vias de permeação da membrana externa bacteriana pelas duas quinolonas de comportamento e características manifestamente distintas, o AN e a MX. Este tipo de estudo permite realçar uma interacção com a porina ao nível do interior do canal hidrofílico, distinguindo-se assim uma permeação por via porínica de uma permeação por via hidrofóbica. A presença da MX no interior do canal porínico constitui indicação de uma permeação por via, predominantemente, porínica. Já para o AN a ausência de efeitos sobre a condutividade iónica de OmpF é sugestiva de uma interacção com a porina a um nível meramente periférico, o que aponta, em conjugação com a sua maior hidrofobicidade, para uma permeação por via hidrofóbica.

A permeação difusiva da bicamada fosfolipídica constitui uma via de entrada na célula bacteriana para as quinolonas que, tal como o AN, demonstrem maior hidrofobicidade, contudo, para as quinolonas mais hidrofílicas, como a CP, GP e MX, esta via de permeação se vista de forma isolada demonstra-se pouco provável, facto confirmado por valores de K_p não muito elevados, e pela verificação de uma localização periférica destas quinolonas na bicamada. A entrada de determinada quinolona na célula bacteriana pode, assim, ser pensada como uma soma de contribuições das vias porínica e não porínica, sendo a contribuição total de cada uma das parcelas avaliada de acordo com a hidrofobicidade da quinolona. Assim, se numa fase inicial de interacção periférica com a bicamada a presença do antibiótico desencadear uma destabilização estrutural da membrana, esta destabilização nas fases posteriores poderá resultar num acesso facilitado

quer à entrada por via hidrofóbica, quer à entrada pela porina. A prevalência de uma via relativamente à outra estará depois dependente das características da quinolona.

No caso concreto da MX, as alterações introduzidas na sua estrutura, para além de incrementarem a componente hidrofóbica (aumento relativo do seu K_p) provocaram também uma alteração no seu comportamento ácido-base, daqui resultando um aumento da concentração das espécies de ião dipolar e catiónica a pH fisiológico o que se torna vantajoso quer para a permeação membranas por via porínica (OmpF tem selectividade catiónica e a sua permeação por espécies dipolares mostra-se favorecida), e na interacção com superfícies membranares de carga negativa como acontece nas bactérias de Gram (+). Ou seja, esta capacidade não específica de permear os diferentes invólucros bacterianos poderá constituir a justificação para o seu largo espectro de actividade antibacteriana e a sua distinção em relação a quinolonas de gerações anteriores.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Garrett, J., Osswald, W. 1987. Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas, II Volume, 2ª Edição, Porto Editora.
2. Goodman & Gilman's, 1996. The pharmacological basis of therapeutics. 9th ed. New York: McGraw – Hill Inc.
3. Quintiliani, R., Owens, R. C. J., Grant, E. M. 1999. Clinical role of fluoroquinolones in patients with respiratory tract infections. Infectious diseases in clinical practice, 8 (suppl. 1): S28- S41.
4. Murray, P. R., Rosenthal, K. S., Kobayashi, G. S., Pfaller, M. A. 1998. 3ª Edição, Guanabara Koogan.
5. Anglada, R. R. 1997. Microbiología sanitaria y clínica. Editorial Síntesis, Madrid.
6. American Pharmaceutical Association (APhA). New Product Bulletin: AveloxTM (moxifloxacin HCl).
7. Drakopoulos, A. I., Ioannou, P. C. 1997. Spectrofluorimetric study of the acid-base equilibria and complexation behaviour of the fluoroquinolone antibiotics ofloxacin, norfloxacin, ciprofloxacin and pefloxacin in aqueous solution. Analytica Chimica Acta, 354: 197-204.
8. Park, H. –R., Kim, T. H., Bark, K. –M. 2002. Physicochemical properties of quinolone antibiotics in various environments. European Journal of Medical Chemistry, 37: 443-460.
9. Albini, A., Monti, S. 2003. Photophysics and photochemistry of fluoroquinolones. Chemical Society Reviews, 32: 238-250.
10. Neves, P., Leite, A., Gameiro, P., Rangel, M., Castro, B. 2007. Involvement of structural factors on the enhanced activity of moxifloxacin: a fluorescence and EPR spectroscopic study. Analytical Bioanalytical Chemistry, 387 (4): 1543-1552.
11. Rodrigues, C., Gameiro, P., Reis, S., Lima, J. L. F. C., Castro, B. 2002. Interaction of grepafloxacin with large unilamellar liposomes: partition and fluorescence studies reveal the importance of charge interaction. Langmuir, 18: 10231-10236.
12. Smith, J. T., Lewin, C. S. 1988. The Quinolones. Academic Press, New York.
13. Ferreira, W. F. C., de Sousa, J.C.F., 1998. Microbiologia. Volume I. Editora Lidel.
14. Bedard, J., Wong, S., Bryan, L. E., 1987. Accumulation of Enoxin by *E. coli* and *Bacillus subtilis*. Antimicrobial Agents chemotherapy 31, 1348-1354.

15. Chevalier, J., Mallaé, M., Pagés, J. M., 2000. Comparative aspects of the diffusion of norfloxacin, cefepime and spermine through the F porin channel of *Enterobacter cloacae*. *Biochemistry Journal*, 348: 223-227.
16. Hirai, D., Aoyama, H., Irikura, T., Iyobe, S., Mitsunashi, S., 1986. Differences in susceptibility to quinolone of outer membrane mutants of *Salmonella typhimurium* and *E. coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 29, 535-538.
17. Bedard, J., Bryan, L. E., 1989. Interaction of fluoroquinolone antimicrobial agents ciprofloxacin and enoxin with liposomes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 33: 1379-1382.
18. Prescott, L., Harley, J., Kein, D., 1996. *Microbiology*. 3rd edition. Wm. C. Brown Publishers.
19. Kadner, R. J., Franklund, C. V., Lathrop, J. T., 1996. *Handbook of biological physics*, Chap.28, Vol.II. Elsevier Science B.V.
20. 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.
21. Koebnik, R., Locher, K. P., Gelder, P. V., 2000. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Molecular Microbiology*, 37 (2): 239-253.
22. 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.
23. Cowan, S. W., Schirmer, T., Rummel, G., Steiert, M., Ghosh, R., Paupit, R. A., Jansonius, J. N., Rosenbusch, J. P., 1992. Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature*, 358: 727-733.
24. Benz, R., Bauer, K., 1988. Permeation of hydrophilic molecules through the outer membrane of Gram-negative bacteria. *European Journal of Biochemistry*, 176: 1-19.
25. Schwarzott, M., Engelhardt, H., Kliihspies, T., Baurecht, D., Naumann, D., Fringeli, U. P., 2003. In Situ FTIR ATR Spectroscopy of the Preparation of an Oriented Monomolecular Film of Porin Omp32 on an Internal Reflecting Element by Dialysis. *Langmuir*, 19: 7451-7459.
26. 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 large pore size. *The Journal of Biological Chemistry*, 271 (34): 20669-20675.
27. Bransburg-Zabary, S., Nachliel, E., Gutman, M., 2004. The most probable trajectory for ion flux through large pore channel. *Solid State Ionics*, 168: 235-243.
 28. Philippsen, A., Im, W., Engel, A., Schirmer, T., Roux, B., Müller, D. J., 2002. Imaging the Electrostatic Potential of Transmembrane Channels: Atomic Probe Microscopy of OmpF Porin. *Biophysical Journal*, 82: 1667-1676.
 29. Phale, P. S., Philippsen, A., Kiefhaber, T., Koebnik, R., Phale, V. P., Schirmer, T., Rosenbusch, J. P., 1998. Stability of trimeric OmpF porin: The contributions of the latching loop L2. *Biochemistry*, 37: 15663-15670.
 30. Vidal, S., Bredin, J., Pagès, J. -M., Barbe, J., 2005. β -lactam screening by specific residues of the OmpF eyelet. *Journal of Medical Chemistry*, 48: 1395-1400.
 31. 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.
 32. Schirmer, T., Phale, P. S., 1999. Brownian dynamics simulation of ion flow through porin channels. *Journal of Molecular Biology*, 294: 1159-1167.
 33. Weiss, M. S., Abele, U., Weckesser, J., Welte, W., Schlitz, E., Schulz, G. E., 1991. Molecular architecture and electrostatic properties of a bacterial porin. *Science*, 254: 1627-1630.
 34. Danelon, C., Suenaga, A., Winterhalter, M., Yamato, I., 2003. Molecular selectivity in OmpF porin: single channel vs. free energy calculation. *Biophysical Chemistry*, 104: 591-603.
 35. Rosenbusch, J. P., 1974. Characterization of the major envelope protein from *Escherichia coli*, regular arrangement on the peptidoglycan and unusual dodecyl sulfate binding. *Journal of Biological Chemistry*, 249: 8019-8029.
 36. Schindler, M., Rosenbusch, J. P., 1984. Structural transition of porin, a transmembrane protein. *FEBS Letters*, 173 (1): 85-89.
 37. Schenkman, S., Tsugita, A., Schwartz, M., Rosenbusch, J. P., 1984. Topology of a phage lambda receptor protein, mapping targets of proteolytic cleavage. *Journal of Biological chemistry*, 259: 7570-7576.
 38. 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.

39. Lakowicz, J. R., 1999. Principles of fluorescence spectroscopy. Second edition. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
40. Pattnaik B. R., Ghosh S., Rajeswari M. R., 1997. Selective Excitation of Tryptophans in OmpF: A fluorescence emission study. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 42 (1): 173-181.
41. Loura, L. M. S., Almeida, R. F. M., 2004. Tópicos de Biofísica de Membranas. LIDEL- Edições Técnicas Lda, Lisboa.
42. Atwood, D., Florence, A. T., 1983. Surfactant systems. Their chemistry, pharmacy and biology. Chapman and Hall. New York.
43. New, R. R. C., 1990. Liposomes- a practical approach. Rickwood, D., Hames, B. D., Eds. IRL Press, Oxford.
44. Bangham, A. D., Standish, M. M., Watkins, J. C., 1965. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, 13: 238-252.
45. Bangham, A. D., Standish, M. M., Weissmann, G., 1965a. The action of steroids and streptolysin S on the permeability of phospholipid structures to cations. *Journal of Molecular Biology*, 13: 253-259.
46. Irma, A. J. M., Bakker-Woudenberg, M. T. K., Storm, G., Etten, E. W. M., 1998. Administration of liposomal agents and phagocytic function of the mononuclear phagocyte system. *International Journal of Pharmaceutics*, 162: 5-10.
47. Gregoriadis, G., 2001. Drug and vaccine delivery systems. *Drug Delivery*, 172-176.
48. Jones, M. N., Chapman, D., 1995. Micelles, monolayers and biomembranes. Wiley-Liss Inc., New York.
49. Fendler, J. H., 1980. Surfactant vesicles as membrane mimetic agents: Characterization and Utilization. *Acc. Chem. Res.*, 13: 1-13.
50. Cevc, G., Marsh, D., 1987. Phospholipid bilayers: Physical principles and models. Wiley, New York.
51. Evans, D. F., Ninham, B. W., 1986. Molecular forces in the self organization of amphiphiles. *Journal of Physics and Chemistry*, 90: 226-234.
52. Hope, M. J., Bally, M. B., Mayer, L. D., Janoff, A. S., Cullis, P. R., 1986. Generation of multilamellar and unilamellar phospholipid vesicles. *Chemistry and Physics of lipids*, 40: 89-107.
53. Sharma, A., Sharma, U. S., 1997. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics*, 154: 123-140.

-
54. Lasic, D. D., 1993. Liposomes-from physics to applications. Elsevier, Amsterdam.
 55. Boggs, J. M., 1987. Lipid intermolecular hydrogen bonding: influence on structural organization and membrane function. *Biochimica et Biophysica Acta*, 906: 353-404.
 56. Seelig, J., Macdonald, P. M., Scherer, P. G., 1987. Phospholipid head groups as sensors of electric charge in membranes. *Biochemistry*, 26 (24): 7535-7541.
 57. Mayer, L. D., Hope, M. J., Cullis, P. R., Janoff, A. S., 1985. Solute distributions and trapping efficiencies observed in freeze-thawed multilamellar vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 817:193-196.
 58. Mayer, L. D., Hope, M. J., Cullis, P. R., 1986. Vesicles of variable sized produced by rapid extrusion procedure. *Biochimica et Biophysica Acta*, 858:161-168.
 59. Castile, J. D., Taylor, K.M.G., 1999. Factors affecting the size distribution of liposomes produced by freeze-thaw extrusion. *International Journal of Pharmaceutics*, 188: 87-95.
 60. Hope, M. J., Bally, M. B., Webb, G., Cullis, P. R., 1985. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distributions, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochimica et Biophysica Acta*, 812:55-65.
 61. Nayar, R., Hope, M. J., Cullis, P. R., 1989. Generation of large unilamellar vesicles from long-chain saturated phosphatidylcholines by extrusion technique. *Biochimica et Biophysica Acta*, 986:200-206.
 62. Pramauro, E., Pelizzetti, E., 1996. Surfactants in analytical chemistry. Applications of organized amphiphilic media. Elsevier, New York.
 63. Machleidt, H., Roth, S., Seeman, P., 1972. The hydrophobic expansion of erythrocyte membranes by the phenol anesthetics. *Biochimica et Biophysica Acta*, 255:178-189.
 64. Franks, N. P., Lieb, W. R., 1986. Partitioning of long chain alcohols into lipid bilayers: Implications for mechanisms of general anesthesia. *Proceedures of the National Academy of science*, 83: 5116-5120.
 65. Goormaghtigh, E., Ruyschaert, J. M., 1984. Anthracycline glycoside-membrane interactions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 779:271-288.
 66. Rhodes, D. G., Newton, R., Butler, R., Herbette, L., 1992. Equilibrium and kinetic studies of the interactions of salmeterol with membrane bilayers. *Molecular Pharmacology*, 42 (4): 596-602.
-

67. Wadkins, R. M., Houghton, P. J., 1993. The role of drug-lipid interactions in the biological activity of modulators of multi-drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1153:225-236.
68. Herbette, L.G., Vant Erve, Y. M., Rhodes, D. G., 1989. Interaction of 1,4-dihydropyridine calcium channel antagonists with biological membranes: lipid bilayer partitioning could occur before drug binding to receptors. *Journal of Mol. Cell. Cardiology*, 21 (2): 187-201.
69. Mason, R. P., Rhodes, D. G., Herbette, L. G., 1991. Reevaluating equilibrium and kinetic binding parameters for lipophilic drugs based on a structural model for drug interaction with biological membranes. *Journal of medical Chemistry*, 34(3): 869-877.
70. Young, H. S., Skita, V., Mason, R. P., Herbette, L. G., 1992. Molecular basis for the inhibition of 1, 4- dihydropyridine calcium channel drugs binding to their receptors by a nonspecific site interaction mechanism. *Biophysical Journal*, 61 (5): 1244-1255.
71. Herbette, L. G., Mason, P. E., Gaviraghi, G., Tulenko, T. N., Mason, R. P., 1994. The molecular basis for Lacidipine's unique pharmacokinetics : optimal hydrophobicity results in membrane interactions that may facilitate the treatment of Atherosclerosis. *Journal of Cardiovascular pharmacology*, 23 (5): S16-S25.
72. Fendler, J. H., 1982. *Membrane mimetic chemistry*. John Wiley & Sons, Inc. New York.
73. Seddon, A. M., Curnow, P., Booth, P. J., 2004. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1666:105-117.
74. Lund, S., Orłowski, S., Foresta, B., Champeil, P., Le Maire, M., Møller, J. V., 1989. Detergent structure and associated lipid as determinants in the stabilization of solubilized Ca^{2+} -ATPase from sarcoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 264: 4907-4915.
75. Sardet, C., Tardieu, A., Luzzati, V., 1976. Shape and size of bovine rhodopsin-small angle X-ray scattering study of a rhodopsin detergent complex. *Journal of Molecular Biology*, 105: 383-407.
76. Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, R. H., Huber, R., Michael, H., 1985. Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* at 3 Å resolution. *Nature*, 318:618-624.

77. Carey, M. C., Small, D. M., 1970. The characteristics of mixed micellar solutions with particular reference to bile. *The American Journal of Medicine*, 49 (5): 590-608.
78. Carey, M. C., Small, D. M., 1972. Micelle formation by bile salts. Physical-chemical and thermodynamic considerations. *Archive Internal Medicine*, 130: 506-527.
79. Ollivon, M., Lesieur, S., Grabielle-Madelmont, C., Paternostre, M., 2000. Vesicle reconstitution from lipid-detergent mixed micelles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1508: 34-50.
80. Sanders, C. R., Prosser, R. S., 1998. Bicelles: a model membrane system for all seasons? *Structure*, 6: 1227-1234.
81. 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.
82. Jain, M. K., Zakim, D., 1987. The spontaneous incorporation of proteins into preformed bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 906: 33-68.
83. Rigaud, J. -L., Pitard, B., Levy, D., 1995. Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1231:223-246.
84. Sharom, F. J., Eckford, P. D. W., 2003. Reconstitution of membrane transporters. *Methods of Molecular Biology*, 227: 129-154.
85. Szoka, F., Papahadjopoulos, D., 1978. Procedure of preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*, 75: 4194-4198.
86. Oku, N., MacDonald, R. C., 1983. Differential effects of alkali metal chlorides on formation of giant liposomes by freezing and thawing and by dialysis. *Biochemistry*, 22 (4): 855-863.
87. Riquelme, G., Lopes, E., Garcia-segura L. M., Ferragut, J. A., Gonzalez-ros, J. M., 1990. Giant liposomes: a model system in which to obtain patch-clamp recordings of ionic channels. *Biochemistry*, 29(51): 11215-11222.
88. Eytan, G., Matherson, M. J., Racker, E., 1976. Incorporation of mitochondrial membrane proteins into liposomes containing acidic phospholipids. *Journal of Biological Chemistry*, 251: 6831-6837.

89. Carroll, R. C., Racker, E., 1977. Preparation and characterization of cytochrome c oxidase vesicles with high respiratory control. *Journal of Biological Chemistry*, 252: 6981-6990.
90. Eytan, G. D., Broza, R., 1978. Role of charge and fluidity in the incorporation of cytochrome oxidase into liposomes. *Journal of Biological Chemistry*, 253: 3196-3202.
91. Enoch, H. G., Flemming, P. J., Strittmatter, P., 1979. The binding of cytochrome b5 to phospholipid vesicles and biological membranes. Effect of orientation on intermembrane transfer and digestion by carboxypeptidase Y. *Journal of Biological Chemistry*, 254: 6483-6488.
92. Greehut, S. F., Rosenman, H. A., 1985. Distribution of cytochrome b5 between sonicated phospholipid vesicles of different size. *Journal of Biological Chemistry*, 260: 5883-5886.
93. Eytan, G. D., 1982. Use of liposomes for reconstitution of biological functions. *Biochimica et Biophysica Acta, Reviews on Biomembranes*, 694 (2): 185-202.
94. Rigaud, J. -L., Paternóster, M. -T., Bluzart, A., 1988. Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution. Procedures involving the use of detergents. 2. Incorporation of the light-driven proton pump Bacteriorhodopsin. *Biochemistry*, 27: 2677-2688.
95. Levy, D., Gulik, A., Seigneuret, M., Rigaud, J. -L., 1990. Phospholipid vesicle solubilization and reconstitution by detergents. Symmetrical analysis of the two processes using octaethylene glycol mono-N-dodecyl ether. *Biochemistry*, 29 (40): 9480-9488.
96. Levy, G., Bluzat, A., Seigneuret, M., Rigaud, J. -L., 1991. A systematic study of liposome and proteoliposome reconstitution involving Bio-Bead-mediated Triton X-100 removal. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1025 (2): 179-190.
97. Lehotsky, J., Raeymaekers, L., Missiaen, L., 1992. Stimulation of the catalytic cycle of the Ca^{2+} pump of porcine plasma-membranes by negatively charged phospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1105: 118-124.
98. Pinto, F. D., Adamo, H. P., 2002. Deletions in the acidic lipid-binding region of the plasma membrane Ca^{2+} pump- a mutant with high affinity for Ca^{2+} resembling the acidic lipid-activated enzyme. *Journal of Biologic Chemistry*, 277 (12): 784-789.

99. McNaught, A., Wilkinson, A., 1997. Compendium of chemical terminology. IUPAC Recommendation. 2nd Ed. BlackWell Science.
100. Leo, A., Hansch, C., Elkins, D., 1971. Partition coefficients and their uses. Chemistry Reviews, 71 (6): 525-552.
101. Hansch, C., Dunn, III W. J., 1972. Linear relationships between lipophilic character and biologic activity of drugs. Journal of Pharmaceutical science, 61 (1): 1-19.
102. Alcorn, C. J., Simpson, R. J., Leathy, D. E., Peters, T. J., 1993. Partition and distribution coefficients of solutes and drugs in brush border membrane vesicles. Biochemistry and Pharmacology, 45 (9): 1775-1782.
103. Lalor, C. R., Flynn, G. L., Weiner, N., 1994. Formulation factors affecting release of drug from topical vehicles. 1. Effect of emulsion type upon *in vitro* delivery of n-alkyl p-aminobenzoate. Journal of Pharmaceutical science, 84 (11): 1525-1528.
104. Lalor, C. R., Flynn, G. L., Weiner, N., 1995. Formulation factors affecting release of drug from topical vehicles. 2. Effect of solubility on in vitro delivery of a series of n-alkyl p-aminobenzoates. Journal of Pharmaceutical science, 84 (6): 673-676.
105. Hansch, C., Clayton, J. M., 1973. Lipophilic character and biological activity of drugs II: The parabolic case. Journal of Pharmaceutical science, 62 (1): 1-21.
106. Krämer, S. D., Jakits-Deiser, C., Wunderli-Allenspach, H., 1997. Free fatty acids cause pH-dependent changes in drug-lipid membrane interactions around physiological pH. Pharmaceutical research, 14 (6): 827-832.
107. Avdeef, A., Box, K. J., Corner, J. E. A., Hibbert, C., Tam, K. Y., 1998. pH-metric log P. Determination of liposomal membrane-water partition coefficients of ionizable drugs. Pharmaceutical research, 15 (2): 209-215.
108. De Young, L. R., Dill, K. A. 1988. Solute partitioning into lipid bilayer membranes. Biochemistry, 27: 5281-5289.
109. Kubinyi, H., 1995. The quantitative analysis of structure activity relationship: M. E. Wolff (Ed.) Burger's medicinal chemistry and drug discovery, 1, John Wiley & Sons, New York.
110. Neal, S. L., Villegas, M. M., 1995. Phospholipid vesicles as organized media in spectroluminescence analysis. Analytical Chemistry, 67: 2659-2665.
111. Gücer, N., Ebel, J., Gröning, R., 1993. Encapsulation of drugs and excipients in liposomes- measurements with drug-specific electrodes. Pharmaceutical Acta Helv., 68: 129-133.

112. Vásquez, J. L., Montero, M. T., Trias, J., Hernández-Borrel, J., 1998. 6-Fluoroquinolone-liposome interactions: Fluorescence quenching study using iodide. *International Journal of Pharmaceutics*, 171: 75-86.
113. Singer, M. A., 1977. Interaction of dibucaine and propranolol with phospholipid bilayer membranes- effect of alterations in fatty acyl composition. *Biochemical Pharmacology*, 26: 51-57.
114. Venema, F. R., Weringa, W. D., 1988. The interactions of phospholipid vesicles with some antiinflammatory agents. *Journal of Colloid and Interface Science*, 125: 484-492.
115. Antunes-Madeira, M. C., Madeira, V. M. C., 1987. Partition of malathion in synthetic and native membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 901: 61-66.
116. Blatt, E., Sawyer, W. H., 1985. Depth-dependent fluorescent quenching in micelles and membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 822: 43-62.
117. Pinto, L. M. A., Yokaichiya, D. K., Fraceto, L. F., Paula, E., 2000. Interaction of benzocaine with model membranes. *Biophysical Chemistry*, 87: 213-223.
118. Hauser, H., Penkett, S. A., Chapman, D., 1969. Nuclear magnetic resonance spectroscopic studies of procaine hydrochloride and tetracaine hydrochloride at lipid-water interfaces. *Biochimica et Biophysica Acta*, 183: 466-475.
119. Rodrigues, C., Gameiro, P., Reis, S., Lima, J. L. F. C., Castro, B., 2002. Interaction of Grepafloxacin with large unilamellar liposomes: partition and fluorescence studies reveal the importance of charge interactions. *Langmuir*, 18: 10231-10236.
120. 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.
121. Di Giulio, A., Maurizi, G., Saletti, M. A., Amicosante, G., Mazzeo, P., Oratore, A., 1989. the ultraviolet derivative spectrophotometric determination of neutral liposome-entrapped β -lactam antibiotics. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, 7: 1159-1164.
122. Owen, A. J., 1998. Quantitative UV-visible analysis in the presence of scattering. *Spectroscopy Europe*, 26-28.
123. Talsky, G., Mayring, L., Kreuzer, H., 1978. High-resolution, high-order UV/VIS derivative spectrophotometry. *Angewandte Chemie*, 17: 785-874.
124. O'Haver, T. C., 1979. Derivative and wavelength modulation spectrometry. *Analytical Chemistry*, 51: 91-100.

125. Gürsoy, A., Senyucel, B., 1997. Characterization of ciprofloxacin liposomes: derivative ultraviolet spectrophotometric determinations. *Journal of Microencapsulation*, 14(6): 769-776.
126. Rojas, F. S., Ojeda, C. B., Pavon, J. M. C., 1988. Derivative ultraviolet-visible region absorption spectrophotometry and its applications. *Talanta*, 35: 753-761.
127. Slavic, J., 1994. *Fluorescent probes in cellular and molecular biology*. Prague, Czech Republic.
128. Hoshino, M., Imamura, M., Ikehara, K., Hama, Y., 1981. Fluorescence enhancement of benzene derivatives by forming inclusion complexes with β -cyclodextrin in aqueous solutions. *Journal of Physics and Chemistry*, 85: 1820-1823.
129. Mwalupindi, A. G., Rideau, A., Agbaria, R. A., Warner, I. M., 1994. Influence of organized media on the absorption and fluorescence spectra of auramine-O dye. *Talanta*, 41: 599-609.
130. Coutinho, A., Prieto, M., 1995. Self-association of the polyene antibiotic nystatin in dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles: a time-resolved fluorescence study. *Biophysical Journal*, 69: 2541-2557.
131. Pedrós, J., Gómez, C. M., Campos, A., Abad, C., 1997. A fluorescence spectroscopy study of the interaction of monocationic quinine with phospholipid vesicles. Effect of the ionic strength and lipid composition. *Spectrochimica Acta, Part A*, 53: 2219-2228.
132. Coutinho, A., Prieto, M., 1993. Ribonuclease T₁ and Alcohol dehydrogenase fluorescence quenching by acrylamide. *Journal of Chemical Education*, 70: 425-428.
133. Möller, M., Denicola, A., 2002. Protein tryptophan accessibility studied by fluorescence quenching. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 30 (3): 175-178.
134. Chalpin, D. B., Kleinfeld, A. M., 1983. Interaction of fluorescence quenchers with the n-(9-anthroxyl) fatty acid membrane probes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 731: 465-474.
135. Zerhouni, S., Amrani, A., Nijs, M., Smolders, N., Azarkan, M., Vincentelli, J., Looze, Y., 1998. Purification and characterization of papaya glutamine cyclotransferase, a plant enzyme highly resistant to chemical, acid and thermal denaturation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1387: 275-290.

136. Fato, R., Battino, M., Esposti, M. D., Castelli, G. P., Lenaz, G., 1986. Determination of partition and lateral diffusion coefficients of ubiquinines by fluorescence quenching of n-(9-anthroyloxy) stearic acids in phospholipid vesicles and mitochondrial membranes. *Biochemistry*, 25: 3378-3390.
137. Cantor & Schimmel, 1980. *Biophysical Chemistry. Part II*. W. H. Fresman and Company, New York.
138. Nagle, J. F., Tristram-Nagle, S., 2000. Structure of lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1469:159-195.
139. Martin, D. W., 1983. Active unit of solubilized sarcoplasmic reticulum calcium adenosinetriphosphatase: an active enzyme centrifugation analysis, *Biochemistry*, 22: 2276 – 2282.
140. Vázquez, J. L., Montero, M. T., Merino, S., Domenech, O., Berlanga, M., Vinas, M., Hernandez-Borrel, J., 2001. Location and Nature of the Surface Membrane Binding Site of Ciprofloxacin: A Fluorescence Study. *Langmuir*, 17: 1009-1014.
141. Cowan, S. W., Garavito, R. M., Jansonius, J. N., Jenkins, J. A., Karlsson, R., König, N., Pai, E. F., Pauptit, R. A., Rizkallah, P. J., Rosenbusch, J. P., Rummel, G., Schimer, T., 1995. The structure of OmpF porin in a tetragonal crystal form. *Structure*, 10: 1041-50.
142. Fernandes, F., Neves, P., Gameiro, P., Loura, L. M. S., Prieto, M., 2007. Ciprofloxacin interactions with bacterial protein OmpF: modeling of FRET from a multi-tryptophan protein trimer. *Submetido*.
143. Neves, P., Berkane, E., Gameiro, P., Winterhalter, M., de Castro, B., 2005. Interaction between quinolones antibiotics and bacterial outer membrane porin OmpF. *Biophysical Chemistry*, 113: 123-128.
144. Jähnig, F., 1979. Structural order of lipids and proteins in membranes: evaluation of fluorescence anisotropy data. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 76 (12): 6361-6365.

145. Ikeda, T., Tazuke, S., Watanabe, M., 1983. Interaction of biological active molecules with phospholipid membranas. Fluorescence depolarization studies on the effect of polymeric biocide bearing biguanide groups in the main chain. *Biochimica et Biophysica Acta*, 735: 380-386.
146. Moya-Quiles, M. R., Muñoz, Delgado, E., Vidal, C. J., 1996. Effects of the pyrethroid insecticide permethrin on membrane fluidity. *Chemistry and Physics of lipids*, 79: 21-28.
147. Kaiser, R. D., London, E., 1998. Location of diphenylhexatriene (DPH) and its derivatives within membranes: comparison of different fluorescent quenching analyses of membrane depth. *Biochemistry*, 37: 8180-8190.
148. Devaux, P. F., 1983. ESR and NMR studies of lipid protein interactions in membranes. *Biological Magnetic Resonance*. Vol.V. Edited by L. Berliner & J. Reubene. Plenum Publishers, New York.
149. Hubbell, W. L., McConnell, H. M., 1971. Molecular motion in spin-labeled phospholipids and membranes. *Journal of the American Chemical Society*, 93 (2): 314-326.
150. Connors, K. A., 1987. Binding Constants. The measurement of molecular complex stability. Wiley-Interscience Publication.
151. Connors, K. A., Mollica, J.A., 1966. Theoretical analysis of comparative studies of complex formation: Solubility, spectral, and kinetic techniques. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55 (8): 772-780.
152. Attie, A. D., Raines, R. T., 1995. Analysis of receptor-ligand interactions. *Journal of Chemical Education*, 72(1): 119-124.
153. Benesi, H. A., Hildebrand, J. H., 1949. A spectrophotometric investigation of the interaction of iodine with aromatic hydrocarbons. *Journal of American Chemical Society*, 71(8): 2703-2707.
154. Ladokhin, A. S., 1999. Evaluation of lipid exposure of tryptophan residues in membrane peptides and proteins. *Analytical Biochemistry*, 276: 65-71.
155. Raja, S. M., Rawat, S. S., Chattopadhyay, A., Lala, A. K., 1999. Location and environment of tryptophans in soluble membrane-bound states of a pore-forming toxin from *Staphylococcus aureus*. *Biophysical Journal*, 76: 1469-1479.
156. Montal, M., Mueller, P., 1972. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 69 (12): 3561-3566.

157. Schindler, H., 1989. Planar lipid-protein membranes: strategies of formation and of detecting dependencies of ion transport functions on membrane conditions. *Methods of Enzymology*, 171: 225-253.
158. Winterhalter, M., 1999. Sugar transport through channels reconstituted in planar lipid membranes. *Colloids and Surface*, A149: 547-551.
159. Nikaido, H., Vaara, M., 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiology Review*, 49: 1-32.
160. Lakey, J. H., 1987. Voltage gating in porin channels. *FEBS Letters*, 211: 1-4.
161. Hancock, R. E. W., 1987. Role of porins in outer membrane permeability. *Journal of Bacteriology*, 169: 929-933.
162. Benz, R., 1988. Structure and function of porins from Gram (-) bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 42: 359-393.
163. Schindler, H., Rosenbusch, J. P., 1978. Matrix protein from *Escherichia coli* outer membranes forms voltage-controlled channels in lipid bilayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 75: 3751-3755.
164. Schindler, H., Rosenbusch, J. P., 1981. Matrix protein in planar membranes: clusters of channels in a native environment and their functional reassembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 78: 2302-2306.
165. Dargent, B., Hofmann, W., Pattus, F., Rosenbusch, J. P., 1986. The selectivity filter of voltage-dependent channels formed by phosphoporin (PhoE protein) from *E. coli*. *EMBO Journal*, 5: 773-778.
166. Delcour, A. H., Martinac, B., Adler, J., Kung, C., 1989. Voltage-sensitive ion channel of *Escherichia coli*. *Journal of Membrane Biology*, 112: 267-275.
167. Buechner, M., Delcour, A. H., Martinac, B., Adler, J., Kung, C., 1990. Ion channel activities in the *Escherichia coli* outer membrane. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1024: 111-121.
168. Samartzidou, H., Delcour, A. H., 1998. *E. coli* PhoE porin has an opposite voltage-dependence to the homologous OmpF. *EMBO Journal*, 17: 93-100.
169. Todt, J. C., Rocque, W. J., McGroarty, E. J., 1992. Effects of pH on bacterial porin function. *Biochemistry*, 31: 10471-10478.
170. 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. *Journal of Biological Chemistry*, 271: 20676-20680.

171. Liu, N., Delcour, A. H., 1998. Inhibitory effect of acidic pH on OmpC porin: wild-type and mutants studies. *FEBS Letters*, 434:160-164.
172. Le Dain, A. C., Häse, C. C., Tommassen, J., Martinac, B., 1996. Porins of *Escherichia coli*: unidirectional gating by pressure. *EMBO Journal*, 15: 3524-3528.
173. Iyer, R., Delcour, A. H., 1997. Complex inhibition of OmpF and OmpC bacterial porins by polyamines. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 18595-18601.
174. Samartzidou, H., Delcour, A. H., 1999. Distinct sensitivities of OmpF and PhoE porins to charged modulators. *FEBS Letters*, 444: 65-70.
175. Iyer, R., Wu, Z., Woster, P. M., Delcour, A. H., 2000. Molecular basis for the polyamine-OmpF porin interactions: inhibitor and mutants studies. *Journal of Molecular Biology*, 297: 933-945.
176. Baslé, A., Delcour, A. H., 2001. Effect of two polyamine toxins on the bacterial porin OmpF. *Biochemistry and Biophysics Resumes Communications*, 285: 550-554.
177. Seydel, U., Schröder, G., Brandenburg, K., 1989. Reconstitution of lipid matrix of the outer membrane of Gram-negative bacteria as asymmetric planar bilayer. *Journal of Membrane Biology*, 109: 95-103.
178. Buehler, L. K., Kusumoto, S., Zhang, H., Rosenbusch, J. P., 1991. Plasticity of *Escherichia coli* porin channels: dependence of their conductance on strain and lipid environment. *Journal of Biological Chemistry*, 266: 2446-24450.
179. Wiese, A., Schröder, G., Brandenburg, K., Hirsch, A., Welte, W., Seydel, U., 1994. Influence of the lipid matrix on incorporation and function of LPS-free porin from *Paracoccus denitrificans*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1190: 231-242.
180. Weise, A., Reiners, J. O., Brandenburg, K., Kawahara, K., Zähringer, U., Seydel, U., 1996. Planar asymmetric lipid bilayers of glycosphingolipid or lipopolysaccharide on one side and phospholipids on the other: membrane potential, porin function, and complement activation. *Biophysical Journal*, 70: 321-329.
181. Hagge, S. O., Cock, H., Gustsmann, T., Beckers, F., Seydel, U., Wiese, A., 2002. Pore formation and function of phosphoporin PhoE of *Escherichia coli* are determined by the core sugar moiety of lipopolysaccharide. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 34247-34253.
182. Lakey, J. H., Pattus, F., 1989. The voltage-dependent activity of *Escherichia coli* porins in different planar bilayer reconstitutions. *European Journal of Biochemistry*, 186: 303-308.

183. Phale, P. S., Schirmer, T., Prilipov, A., Lou, K. -L., Hardmeyer, A., Rosenbusch, J. P., 1997. Voltage gating of *Escherichia coli* porin channels: role of the constriction loop. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*, 94: 6741-6745.
184. Watanabe, M., Rosenbusch, J. P., Schirmer, T., Karplus, M., 1997. Computer simulations of the OmpF porin from the outer membrane of *Escherichia coli*. *Biophysical Journal*, 72: 2094-2102.
185. Mobasheri, H., Lea, E. J. A., 2002. Biophysics of gating phenomena in voltage-dependent OmpC mutant porin channels (R74C and R37C) of *Escherichia coli* outer membranes. *European Biophysical Journal*, 31: 389-399.
186. 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 (2-3): 153-167.
187. Rostovtseva, T. K., Nestorovich, E. M., Bezrukov, S. M., 2002. Partitioning of differently sized poly(ethylene glycol)s into OmpF porin. *Biophysical Journal*, 82 (1): 160-169.
188. Alcaraz, A., Nestorovich, E. M., Aguilera-Arzo, M., Aguilera, V. M., Bezrukov, S. M., 2004. Salting out the ionic selectivity of a wide channel: the asymmetry of OmpF. *Biophysical Journal*, 87 (2): 943-957.
189. Feher, G., Weissman, M., 1973. Fluctuation spectroscopy: determination of chemical reaction kinetics from the frequency spectrum of fluctuations. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 70: 870-875.
190. Bezrukov, S. M., Berezhkovskii, A. M., Pustovoyt, M. A., Szabo, A., 2000a. Particle number fluctuations in a membrane channel. *Journal of Chemistry and Physics*, 113: 8206-8211.
191. Bezrukov, S. M., 2000. Ion channels as molecular Coulter counters to probe metabolite transport. *Journal of Membrane Biology*, 174: 1-13.
192. Nestorovich, E. M., Danelon, C., Winterhalter, M., Bezrukov, S. M., 2002. Designed to penetrate: time-resolved interaction of single antibiotic molecules with bacterial pores. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 99 (15): 9789-9794.
193. Benz, R., Schmid, A., Nakae, T., VosScheperkeuter, G. H., 1986. Pore formation by LamB of *Escherichia coli* in lipid bilayer membranes. *Journal of Bacteriology*, 165: 978-986.

194. Benz, R., Schmid, A., VosScheperkeuter, G. H., 1987. Mechanism of sugar transport through the sugar-specific LamB channel of *Escherichia coli* outer membrane. *Journal of Membrane Biology*, 100: 21-29.
195. DeFelice, L. J., 1981. Introduction to membrane noise. Plenum Press, New York.
196. Nekolla, S., Andersen, C., Benz, R., 1994. Noise analysis of ion current through the open and the sugar-induced closed state of the LamB channel of *Escherichia coli* outer membrane: evaluation of the sugar binding kinetics to the channel interior. *Biophysical Journal*, 66: 1388-1397.
197. Andersen, C., Jordy, M., Benz, R., 1995. Evaluation of the rate constants of sugar transport through maltoporin LamB of *Escherichia coli* from the sugar-induced current noise. *Journal of Genetic Physiology*, 105: 385-401.
198. Danelon, C., Lindemann, M., Borin, C., Fournier, D., Winterhalter, M., 2004. Channel-forming membrane proteins as molecular sensors. *IEEE Transactions of Nanobioscience*, 3 (1):46-48.
199. Nakane, J., Wiggin, M., Marziali, A., 2004. A nanosensor for transmembrane capture and identification of single nucleic acid molecules. *Biophysical Journal*, 87 (1): 615-621.
200. Halverson, K. M., Panchal, R. G., Nguyen, T. L., Gussio, R., Little, S. F., Misakian, M., Bavari, S., Kasianowicz, J. J., 2005. Anthrax biosensor, protective antigen ion channel asymmetric blockade. *Journal of Biological Chemistry*, 280 (40): 34056-34062.
201. Vogel, A. I., 1948. A Text Book of Quantitative Analysis: Theory and Practice, Longmans and Green & CO., London.
202. Prilipov, A., Phale P. S., Gelder, P. V., Rosenbusch, J. P., Koebnik R. 1998. Coupling site-directed mutagenesis with high-level expression: large scale production of mutant porins from *E. coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 163: 65-72.
203. Gravito, R. M., Rosenbusch J.P., 1986. Isolation and crystallization of bacterial porin. *Methods of Enzymology*, 125: 309-328.
204. Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
205. Moller, J. V., Maire, M., Anderson, J. P. 1986. Uses of non-ionic and bile salt detergents in the study of membrane proteins. *In Progress in protein-lipid interactions*, vol.2. Watts, A. editor. Elsevier, Amsterdam, 147-196.

206. O'Keeffe, A. H., East, J. M., Lee A.G., 2000. Selectivity in lipid binding of the bacterial outer membrane protein OmpF. *Biophysical Journal*, 79: 2066-2074.
207. Paternostre, M. T., Roux, M., Rigaud, J. -L., 1988. Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. Solubilization of large unilamellar liposomes (prepared by reverse-phase evaporation) by Triton X-100, octyl glucoside and sodium cholate. *Biochemistry*, 27: 2668-2677.
208. Plançon, L., Chami, M., Letellier, L., 1997. Reconstitution of FhuA, an *Escherichia coli* outer membrane protein, into liposomes. *The Journal of Biological Chemistry*, 272 (27): 16868-16872.
209. Knol, J., Sjollem, K., Poolman, B., 1998. Detergent-mediated reconstitution of membrane proteins. *Biochemistry*, 37: 16410-16415.
210. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150: 76-85.
211. Wiechelman, K. J., Braun, T. D., Fitzpatrick, J. D., 1988. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Analytical Biochemistry*, 175: 231-237.
212. Rodrigues, C., Gameiro, P., Reis, S., Lima, J. L. F. C., Castro, B., 2001. Spectrophotometric determination of drug partition coefficients in dimyristoyl-L- α -phosphatidylcholine/water: a comparative study using phase separation and liposome suspensions. *Analytical Chemical Acta*, 428: 103-109.
213. Rodrigues, C., Gameiro, P., Reis, S., Lima, J. L. F. C., Castro, B., 2001. Derivative spectrophotometry as a tool for the determination of drug partitions in water / dimyristoyl-L- α -phosphatidylglycerol (DMPG) liposomes. *Biophysical Chemistry*, 94: 97-106.
214. Savitzky, A., Golay, M. J. E., 1964. Smoothing and differentiation of data. *Analytical Chemistry*, 36: 1627-1639.
215. Swamy, M. J., Marsh, D., 2001. Spin-label electron paramagnetic resonance studies on the interaction of avidin with dimyristoyl-phosphatidylglycerol membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1513: 122-130.
216. Hendrich, A. B., Wesolowska, O., Komorowska, M., Motohashi, N., Michalak, K., 2002. The alterations of lipid bilayer fluidity induced by newly synthesized phenothiazine derivative. *Biophysical Chemistry*, 98: 275-285.

-
217. Arora, A., Williamson, I. M., Lee, A. G., Marsh, D., 2003. Lipid-protein interactions with cardiac phospholamban studied by spin-label electron resonance. *Biochemistry*, 42: 5151-5158.
218. Cohen, S. P., Hooper, D. C., Wolfson, J. S., Souza, K. S., McMurry, L. M., Levy, S. B., 1988. Endogenous active efflux of norfloxacin in susceptible *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32: 1187-1191.
219. Nikaido, H., 1989. Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33: 1831-1836.
220. Mortimer, P. G. S., Piddock, L. J. V., 1993. The accumulation of five antibacterial agents in porin-deficient mutants of *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 32: 195-213.
221. Hancock, R., 1984. Alterations in outer membrane permeability. *Annual Review of Microbiology*, 38: 237-264.
222. Chapman, J. S., Georgopapadakou, N. H., 1987. Routes of quinolone permeation in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32 (4): 438-442.
223. Denis, A., Moureau, N. J., 1993. Mechanisms of quinolone resistance in clinical isolates: accumulation of sparfloxacin and of fluoroquinolones of various hydrophobicity, and analysis of membrane composition. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 32: 379-392.
224. Piddock, L. J. V., Hall, M. C., Wise, R., 1990. Mechanism of action of lomefloxacin. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 34: 1088-93.
225. McCaffrey, C., Bertasso, A., Pace, J., Georgopapadakou, N. H., 1992. Quinolone accumulation in *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36: 1601-5.
226. Nikaido, H., Thanassi, D. G., 1993. Penetration of lipophilic agents with multiple protonation sites into bacterial cells: tetracyclines and fluoroquinolones as examples. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37 (7): 1393-1399.
227. Piddock, L. J. V., Jin, Y. F., Griggs, D. J., 2001. Effect of hydrophobicity and molecular mass on the accumulation of fluoroquinolones by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47: 261-270.
228. Montero, M. T., Hernández-Borrel, J., Keough, K. M. W., 1998. Fluoroquinolone-biomembrane interactions: monolayer and calorimetric studies. *Langmuir*, 14: 2451-2454.
-

-
229. Jones, M. E., Visser, M. R., Klootwijk, M., Heisig, P., Verhoef, J., Schmitz, F.-J., 1999. Comparative activities of Clinafloxacin, Grepafloxacin, Levofloxacin, Moxifloxacin, Ofloxacin, Sparfloxacin, and Trovafloxacin and nonquinolones Linozolid, Quinupristin-Dalfopristin, Gentamicin, and Vancomycin against clinical isolates of Ciprofloxacin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(2): 421-423.
230. Hardy, D., Amsterdam, D., Mandell, L. A., Rotstein, C., 2000. Comparative in vitro activities of Ciprofloxacin, Gemifloxacin, Grepafloxacin, Moxifloxacin, Ofloxacin, Sparfloxacin, Trovafloxacin, and other antimicrobial agents against bloodstream isolates of Gram-positive Cocci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(3): 802-805.
231. Johnson, A. P., Warner, M., Livermore, D. M., 2001. Activity of moxifloxacin and other quinolones against pneumococci resistant to first line agents, or with high-level ciprofloxacin resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17: 377-381.
232. Yew, W., Piddock, L., Li, M., Lyon, D., Chan, C., Cheng, A., 1994. In vitro activity of quinolones and macrolides against mycobacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 34: 343-351.
233. Hoffner, S., Gezelius, L., Olsson, L. B., 1997. In vitro activity of fluorinated quinolones and macrolides against *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 40: 885-888.
234. Ruiz-Serrano, M. J., Alcalá, L., Martínez, L., Díaz, M., Marín, M., González-Abad, M. J., Bouza, E., 2000. In vitro activities of six fluoroquinolones against 250 clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* susceptible or resistant to first-line antituberculosis drugs. *Antimicrobial Agents and chemotherapy*, 44(9): 2567-2568.
235. Vázquez, J. L., Merino, S., Domenech, Ò., Berlanga, M., Viñas, M., Montero, M. T., Hernández-Borrel, 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.
236. Ferreira, H., Lúcio, M., Lima, J. L. F. C., Matos, C., Reis, S., 2004. Interaction of clonixin with EPC liposomes used as membrane models. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 94 (6): 1277-1287.
-

-
237. Chakraborty, H., Roy, S., Sarkar, M., 2005. Interaction of oxican NSAIDs with DMPC vesicles: differential partitioning of drugs. *Chemistry and Physics of Lipids*, 138: 20-28.
238. Braun, R. D., 1987. Introduction to instrumental analysis. McGraw-Hill International Editions, New York.
239. Riske, K. A., Nascimento, O. R., Peric, M., Bales, B. L., Lamy-Freund, M. T., 1999. Probing DMPG vesicle surface with cationic aqueous soluble spin label. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1418: 133-146.
240. Kitamura, K., Imayoshi, N., 1992. Second-derivative spectrophotometric determination of the binding constant between chlorpromazine and β -cyclodextrin in aqueous solutions. *Analytical Science*, 8: 497-501.
241. 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.
242. 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.
243. Castro, B., Gameiro, P., Lima, J. L. F. C., Matos, C., Reis, S., 2001. A fast and reliable spectroscopic method for the determination of membrane-water partition coefficients of organic compounds. *Lipids*, 36(1): 89-96.
244. Montero, M. T., Hernández-Borrell, J., 1994. Fluoroquinolone distribution in a phospholipid environment studied by spectrofluorimetry. *Analytica Chimica Acta*, 290: 58-64.
245. 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.
246. 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 (1): 101-105.
247. Grancelli, A., Morros, A., Cabañas, M. E., Domènech, O., Merino, S., Vázquez, J. L., Montero, M. T., Viñas, M., Hernández-Borrell, J., 2002. Interaction of 6-
-

- fluoroquinolones with dipalmitoylphosphatidylcholine monolayers and liposomes. *Langmuir*, 18 (24): 9177-9182.
248. Antunes-Madeira, M. C., Madeira, V. M. C., 1989. Membrane fluidity as affected by the insecticide lindane. *Biochimica et Biophysica Acta*, 982: 161-166.
249. Coderch, L., Fonollosa, J., De Pera, M., Estelrich, J., De La Maza, A., Parra, J. L., 2000. Influence of cholesterol on liposome fluidity by EPR. Relationship with percutaneous absorption. *Journal of Controlled Release*, 68: 85-95.
250. Tajima, K., Imai, Y., Horiuchi, T., Koshinuma, M., Nakamura, A., 1996. ESR study on DMPC and DMPG bilayers in the ($L_a + H_2O$) phase. *Langmuir*, 12: 6651-6658.
251. Pestova, E., Millichap, J. J., Noskin, G. A., Peterson, L. R., 2000. Intracellular targets of Moxifloxacin: a comparison with other fluoroquinolones. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45: 583-590.
252. Lubasch, A., Keller, I., Borner, K., Koeppe, P., Lode, H., 2000. Comparative pharmacokinetics of Ciprofloxacin, Gatifloxacin, Grepafloxacin, Levofloxacin, Trovafloxacin, and Moxifloxacin after single oral administration in healthy volunteers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(10): 2600-2603.
253. Lee, A. G., 2003. Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1612: 1-40.
254. Jackson, M. L., Schmidt, C. F., Lichtenberg, B., Litman, B. J., Albert, A. D., 1982. Solubilization of phosphatidylcholine bilayers by octyl glucoside. *Biochemistry*, 21: 4576-4582.
255. Ollivon, M., Eidelman, O., Blumethal, R., Walter, A., 1988. Micelle vesicle transition of egg phosphatidylcholine and octyl glucoside. *Biochemistry*, 27: 1695-1703.
256. Eidelman, O., Blumethal, R., Walter, A., 1988. Composition of octyl glucoside phosphatidylcholine mixed micelles. *Biochemistry*, 27: 2839-2848.
257. Mazer, N. A., Benedek, G. B., Carey, M. C., 1980. Quasi-electric light scattering studies of aqueous binary lipid systems-mixed micelle formation in bile salt lecithin solutions. *Biochemistry*, 19: 601-606.
258. Almog, S., Kushnir, T., Nir, S., Lichtenberg, D., 1986. Kinetic and structural aspects of reconstitution of phosphatidylcholine vesicles by dilution of phosphatidylcholine sodium cholate mixed micelles. *Biochemistry*, 25: 2597-2605.

-
259. Vinson, P. K., Talmon, Y., Walter, A., 1989. Vesicle-micelle transition of phosphatidylcholine and octyl glucoside elucidated by cryo-transmission electron microscopy. *Biophysical Journal*, 56: 669-679.
260. Walter, A., Vinson, P. K., Kaplan, A., Talmon, Y., 1991. Viewing emulsion with freeze fracture transmission electron microscopy. *Biophysical Journal*, 60: 1315-1325.
261. Eisele, J.-L., Rosenbusch, J. P., 1990. *In Vitro* folding and oligomerization of membrane protein. Transition of bacterial porin from random coil to native conformation. *The Journal of Biological Chemistry*, 265 (18): 10217-10220.
262. Surrey, T., Schmid, A., Jähnig, F., 1996. Folding and membrane insertion of the trimeric β -barrel protein OmpF. *Biochemistry*, 35(7): 2283-2288.
263. Garavito, R. M., Jenkins, J., Jansonius, J. N., Karlsson, R., Rosenbusch, J. P., 1983. X-ray diffraction analysis of matrix porin, an integral membrane protein from *Escherichia coli* outer membranes. *Journal of Molecular Biology*, 164 (2): 313-327.
264. Richard, P., Rigaud, J. -L., Graber, P., 1990. Reconstitution of CF0F1 into liposomes using a new reconstitution procedure. *European Journal of Biochemistry*, 193: 921-930.
265. Levy, D., Gulik, A., Bluzat, A., Rigaud, J. -L., 1992. Reconstitution of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase: mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1107: 283-298.
266. Im, W., Roux, B., 2002. Ions and counterions in a biological channel: A molecular dynamics simulation of OmpF porin from *Escherichia coli* in an explicit membrane with 1 M KCl aqueous salt solution. *Journal of Molecular Biology*, 319 (5): 1177-1197.
267. Surrey, T., Jähnig, F., 1995. Kinetics of the folding and membrane insertion of a β -barrel membrane protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 270 (47): 28199-28203.
268. Kleinschmidt, J. H., Blaauwen, T., Driessen, A. J. M., Tamm, L. K., 1999. Outer membrane protein A of *Escherichia coli* inserts and folds into lipids bilayers by a concerted mechanism. *Biochemistry*, 38: 5006-5016.
269. Pebay-Peyroula, E., Garavito, R. M., Rosenbusch, J. P., Zulauf, M., Timmins, P. A. 1995. Detergent structure in tetragonal crystals of OmpF porin. *Structure*, 3 (10): 1051-1059.
-

-
270. 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: 271-277.
271. Jensen, M. O., Mouritsen, O. G., 2004. Lipids do influence protein function-the hydrophobic matching hypothesis revisited. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1666: 205-226.
272. Camara-Artigas, A., Brune, D., Allen, J. P., 2002. Interaction between lipids and bacterial reaction centers determined by protein crystallography. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 99 (17): 11055-11060.
273. Harrenga, A., Michel, M., 1999. The cytochrome C oxidase from *Paracoccus denitrificans* does not change the metal center upon reduction. *Journal of Biological Chemistry*, 274 (44): 33296-33299.
274. Tocanne, J. -F., Cézanne, L., Lopez, A., Piknová, B., Scharam, V., Tournier, J. -F., Welby, M., 1994. Lipid domains and lipid/protein interactions in biological membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 73: 139-158.
275. Hong, H., Tamm, L. K., 2004. Elastic coupling of integral membrane protein stability to lipid bilayer forces. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 101: 4065-4070.
276. Ball, P., 2000. Quinolone generations: natural history or natural selection? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46 (T1): 17-24.
277. Zukin, R. S., 1979. Evidence for a conformational change in the *Escherichia coli* maltose receptor by excited state fluorescence lifetime data. *Biochemistry*, 18: 2139-2145.
278. Condie, C. C., Quay, S. C., 1983. Conformational studies of aqueous melittin. *Journal of Biological Chemistry*, 258: 8231-8234.
279. Eftink, M. R., 1990. Fluorescence techniques for studying protein structure. *Methods in Biochemical Analyses*, 35: 117-129.
280. Gilardi, G., Mei, G., Rosato, N., Canters, G. W., Finazzi-Agro, A., 1994. Unique environment of Trp48 in *Pseudomonas aeruginosa* azurin as probed by site-directed mutagenesis and dynamic fluorescence anisotropy. *Biochemistry*, 33: 1425-1432.
281. Lakowicz, J. R., Gryczynski, I., Laczko, G., Wicz, W., Johnson, M. L., 1994. Distribution of distances between the tryptophan and the N-terminal residue of

- melittin in its complex with calmodulin, troponin C and phospholipids. *Protein Science*, 3: 628-637.
- 282.** Boteva, R., Zlateva, T., Dorovska-Taran, V., Visser, A. J. W. G., Tsanev, R., Salvato, B., 1996. Dissociation equilibrium of human recombinant interferon γ . *Biochemistry*, 35: 14825-14830.
- 283.** Lakowicz, J. R., Hogen, D., 1980. Chlorinated hydrocarbon-cell membrane interactions studied by the fluorescence quenching of carbazole-labeled phospholipids: Probe synthesis and characterization of the quenching methodology. *Chemistry and Physics of lipids*, 26: 1-40.
- 284.** Moro, F., Goni, F. M., Urbaneja, M. A., 1993. Fluorescence quenching at interfaces and the permeation of acrylamide and iodide across phospholipid bilayers. *FEBS Letters*, 330 (2): 129-132.
- 285.** 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: 3254-3263.
- 286.** Lehrer, S. S., Leavis, P. C., 1978. Solute quenching of protein fluorescence. *Methods in Enzymology*, 49: 222-236.
- 287.** Eftink, M. R., Ghiron, C. A., 1981. Fluorescence Quenching Studies with Proteins. *Analytical Biochemistry*, 114: 199-227.
- 288.** Langner, M., Hui, S. W., 1991. Iodide penetration into lipid bilayers as a probe of membrane lipid organization. *Chemistry and Physics of lipids*, 60: 127-132.
- 289.** Espinosa, V., Kettlun, A. M., Zanoeco, A., Cardemil, E., Valenzuela, M. A., 2003. Differences in nucleotide-binding site of isoapyrases deduced from tryptophan fluorescence. *Phytochemistry*, 63: 7-14.
- 290.** Castro, B., Gameiro, P., Lima, J. L. F. C., Matos, C., Reis, S., 2001. Interaction of drugs with hexadecylphosphocholine micelles. Derivative spectroscopic, acid-base and solubility, studies. *Materials Science and engineering C*, 18: 71-78.
- 291.** Raghuraman, H., Chattopadhyay, A., 2004. Effect of micelar charge on the conformation and dynamics of melittin. *European Biophysics Journal*, 33: 611-622.
- 292.** Mourer, N., Wong, K. F., Hope, M. J., Cullis, P. R., 1998. Anomalous solubility behavior of the antibiotic ciprofloxacin encapsulated in liposomes: a ^1H -NMR study. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1374: 9-20.
- 293.** Dechene, M., Leying, H., Cullman, W., 1990. Role of the outer membrane for quinolone resistance in enterobacteria. *Chemotherapy*, 36: 13-23.

294. Simonet, V., Mallaé, M., Pagès, J. -M., 2000. Substitutions in the eyelet region disrupt cefepime diffusion through the *Escherichia coli* OmpF channel. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44: 311-315.
295. Bredin, J., Saint, N., Mallaé, M., Dé, E., Molle, G., Pagès, J. -M., Simonet, V., 2002. Alteration of pore properties of *Escherichia coli* OmpF induced by mutation of key residues in anti-loop 3 region. *Biochemistry Journal*, 363: 521-528.
296. Bredin, J., Simonet, V., Iyer, R., Delcour, A. H., Pagès, J. -M., 2003. Colicins, spermine and cephalosporins: a competitive interaction with the OmpF eyelet. *Biochemistry Journal*, 376: 245-252.
297. Gans, P., Sabatini, A., Vacca, A., 1996. Investigation of equilibria in solution. Determination of equilibrium constants with the HYPERQUAD suite of programs. *Talanta*, 43: 1739-1753.
298. Blondeau, J. M., 1999. Expanded activity and utility of the new fluoroquinolones: a review. *Clinical Therapy*, 21: 3-40.
299. Blondeau, J. M., 1999. A review of the comparative *in vitro* activities of 12 antimicrobial agents, with a focus on the five new "respiratory quinolones". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 43 (B): 1-11.
300. Sulkowska, A., 2002. Interaction of drugs with bovine and human serum albumin. *Journal of Molecular Structure*, 614: 227-232.
301. Sharom, F. J., Russell, P. L., Qu, Q., Lu, P., 2003. Membrane Transporters: Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology*, 227. Yan, Q., Eds. Humana Press Inc., NJ.
302. Nikaido, H., Rosenberg, E. Y., Foulds, J., 1983. Porin channels in *Escherichia coli*: studies with beta-lactams in intact cells. *Journal of bacteriology*, 153: 232-240.
303. Nikaido, H., Normark, S., 1987. Sensitivity of *Escherichia coli* to various beta-lactams is determined by the interplay of the outer membrane permeability and degradation by periplasmic beta-lactamases: a quantitative predictive treatment. *Molecular Microbiology*, 1:29-36.
304. Verveen, A. A., DeFelice, L. J., 1974. Membrane noise. *Prog. Biophysical Molecular Biology*, 28: 189-265.
305. Bezrukov, S. M., Vodyanoy, I., Parsegian, V. A., 1994. Counting polymers moving through a single ion channel. *Nature*, 370(6487): 279-81.