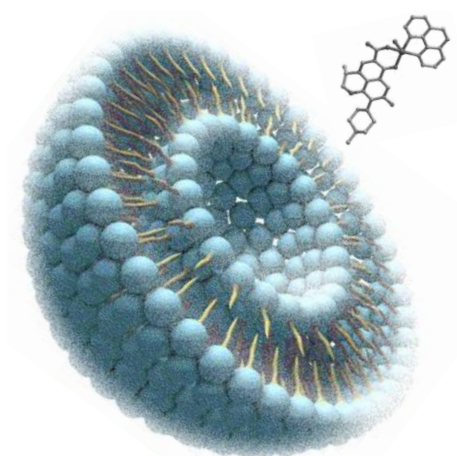




**CLÁUDIA SOFIA
RODRIGUES MATIAS**

**Novas Estratégias para Entender o Sistema de
Influxo de Antibióticos e a Resistência
Antimicrobiana a Nível Molecular**

**New Strategies for Understand the Influx System of
Antibiotics and Antimicrobial Resistance at a
Molecular Level**





**CLÁUDIA SOFIA
RODRIGUES MATIAS**

**Novas Estratégias para Entender o Sistema de
Influxo de Antibióticos e a Resistência
Antimicrobiana a Nível Molecular**

**New Strategies for Understand the Influx System of
Antibiotics and Antimicrobial Resistance at a
Molecular Level**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica da Doutora Paula Gameiro, Professora Auxiliar c/ agregação do Departamento de Química e Bioquímica da Universidade do Porto.

O júri

presidente

Doutora Rita Maria Pinho Ferreira

Professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Alberta Paula Lobo Machado Gameiro dos Santos

Professora auxiliar do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Doutor José Ricardo Ramos Franco Tavares

Professor auxiliar do Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Professora Doutora Paula Gameiro por me dar a oportunidade de realizar a minha Tese de Mestrado no seu laboratório, o que me permitiu adquirir conhecimento consistente no ramo da Biofísica. Ficar-lhe-ei sempre grata pela sua orientação, ideias e comentários, motivação, entusiasmo e amizade demonstradas.

Quero agradecer também à Mariana, por ter sido uma verdadeira “supervisora”. Obrigada pelos ensinamentos, paciência e por todos os comentários úteis ao longo deste ano de trabalho, quer durante a fase prática como escrita da tese.

Obrigada ao Professor Doutor Pedro Domingues, o meu coorientador, por todos os conselhos e pela disponibilidade demonstradas.

À Sílvia, pela ajuda preciosa e por todas as palavras de conforto nos momentos mais difíceis.

Ao Bruno por toda a ajuda, motivação, disponibilidade e amizade demonstradas. Um enorme obrigada por todos os conselhos, pela paciência, por todos os bons momentos, enfim, por me ajudares a ser uma cientista melhor.

Obrigada aos restantes colegas do laboratório e a todos aqueles do Departamento de Química e Bioquímica da Universidade do Porto que, direta ou indiretamente, contribuíram para este trabalho.

Não poderia também deixar de agradecer aqueles que são tudo na minha vida porque sem eles nada disto teria sido possível. Aos meus pais pelo amor incondicional, educação, pela força e por suportarem com todo o gosto os meus estudos na Universidade; à minha irmã por todo o apoio fundamental que me deu, embora separadas pela distância, ela está sempre presente na minha vida; à minha sobrinha por todas as suas maluqueiras e por me ver como um exemplo a seguir e ao Paulinho, por ser um verdadeiro irmão mais velho. Ao Tiago, igualmente pelo apoio incansável, pela confiança e encorajamento. Um obrigada do tamanho do mundo por estares sempre ao meu lado e teres tornado este percurso muito mais fácil. E já agora pela paciência reforçada nos dias mais difíceis. Sem dúvida que fizeste toda a diferença.

À melhor amiga que alguém pode ter, Daniela. Obrigada por tudo. Por todas as conversas no Skype e por todo o carinho que me dás. És uma irmã mesmo.

À Ana Catarina e ao Abílio, os meus queridos amigos desde os tempos da adolescência. Obrigada por todos os cafés, todas as conversas e todas as gargalhadas.

Por fim, à Catarina, o meu braço direito desde que entrei na UA. Obrigada por estes dois anos. Espero que venham muitos mais.

A realização desta tese só foi possível com a ajuda e apoio de muitos outros e, por isso, a todos eles o meu sincero obrigada.

Palavras-chave

Metaloantibióticos, Fluoroquinolonas, Bactérias Gram-negativas, Membrana de *Escherichia coli*, Lipossomas, Resistência Bacteriana, Design de Fármacos, Fluorescência em Modo Estacionário e Resolvida no Tempo.

Resumo

As fluoroquinolonas são antibióticos que têm um largo espectro de ação contra bactérias, especialmente Gram-negativas. O seu mecanismo de ação assenta na inibição de enzimas responsáveis pela replicação do DNA. Porém, devido ao seu uso indevido, o surgimento de resistência bacteriana a estes antibióticos tem-se tornado um grave problema de saúde pública. Uma vez que os seus alvos de ação se situam no meio intracelular, a redução da permeabilidade da membrana externa de bactérias Gram-negativas constitui um dos mecanismos de resistência mais conhecidos. Esta redução é associada à baixa expressão ou mutações em porinas necessárias para permitir o seu transporte, mais concretamente, da OmpF.

Estudos prévios demonstraram que a coordenação de fluoroquinolonas com iões metálicos divalentes e 1,10-fenantrolina (genericamente designados metaloantibióticos) são potenciais candidatos como alternativa às fluoroquinolonas convencionais. Estes metaloantibióticos exibem um efeito antimicrobiano comparável ou superior à fluoroquinolona na forma livre, mas parecem ter uma via de translocação diferente, independente de porinas. Estas diferenças no mecanismo de captura podem ser fundamentais para contornar a resistência bacteriana. De forma a compreender o papel dos lípidos no mecanismo de entrada dos metaloantibióticos, estudou-se a interação e localização dos metaloantibióticos da Ciprofloxacina (2ª geração), da Levofloxacina (3ª geração) e Moxifloxacina (4ª geração) com um modelo de membranas de *Escherichia coli* desprovido de porinas. Estes estudos foram realizados através de técnicas de espectroscopia de fluorescência, por medições em modo estacionário e resolvida no tempo.

Os coeficientes de partição determinados demonstraram uma interação mais elevada dos metaloantibióticos relativamente às respetivas fluoroquinolonas na forma livre, um facto que está diretamente relacionado com as espécies existentes em solução a pH fisiológico. Os estudos de localização mostraram que estes metaloantibióticos devem estar inseridos na membrana bacteriana, confirmando a sua entrada independente de porinas. Este mecanismo de entrada, pela via hidrofóbica, é potenciado por interações eletrostáticas entre as espécies catiónicas de metaloantibiótico que existem a pH 7,4 e os grupos carregados negativamente dos fosfolípidos da membrana. Desta forma, os resultados obtidos neste estudo sugerem que a via de entrada dos metaloantibióticos e das respetivas fluoroquinolonas deve ser diferente. Os metaloantibióticos são candidatos adequados para a realização de mais testes laboratoriais e uma alternativa promissora para substituir as fluoroquinolonas convencionais, uma vez que parecem ultrapassar um dos principais mecanismos de resistência bacteriana a esta classe de antibióticos.

Keywords

Metalloantibiotics, Fluoroquinolones, Gram-negative bacteria, *Escherichia coli* membrane, Liposomes, Bacterial resistance, Drug design, Steady-state and time-resolved fluorescence.

Abstract

Fluoroquinolones are antibiotics that have a large spectrum of action against bacteria, especially Gram-negative. Their mechanism of action relies on the inhibition of the enzymes responsible for DNA replication. Unfortunately, due to their misuse, the emergence of antimicrobial resistance to these antibiotics has been one of the biggest problems of public health. The major permeability cellular barrier of Gram-negative bacteria for quinolones is the outer membrane. To access their target site, quinolones have to overcome this barrier and the reduction of the membrane permeability is a well-known mechanism of resistance. This reduction is associated to the down-regulation or mutations in porins. Some fluoroquinolones require porins to enter the bacterial cell, mainly OmpF.

Previous studies have shown that the coordination of fluoroquinolones to divalent metal ions and 1,10-phenanthroline (known as metalloantibiotics) have potential as antimicrobial agent candidates to replace the conventional fluoroquinolones. These metalloantibiotics exhibit an antimicrobial action comparable or higher than that of fluoroquinolones. Furthermore, their route of translocation is different. This different uptake mechanism can be paramount in counteracting bacterial resistance. In view of the lipids role in bacterial metalloantibiotics uptake, the interaction and the location of Ciprofloxacin (2nd generation), Levofloxacin (3rd generation) and Moxifloxacin (4th generation) metalloantibiotics with *Escherichia coli* model membrane (without porins) were studied. These studies were performed by fluorescence spectroscopy, using time-resolved and steady-state measures.

Partition coefficients determined showed that the interaction is higher for the metalloantibiotics than free fluoroquinolones, which reflects the metalloantibiotics species that are present in solution at physiological pH. Location studies showed that these metalloantibiotics must be located inside the bacterial membrane, confirming their entrance by a porin independent route. This mechanism of metalloantibiotics entry into the bacteria, by the hydrophobic pathway, is strongly dependent of electrostatic interactions. The cationic metalloantibiotics species that exist at pH 7.4 promotes electrostatic interactions with the negatively charged head groups of the membrane lipids.

The results obtained in this work suggest that there is a different translocation route for the metalloantibiotics and its respective free fluoroquinolone. Additionally, metalloantibiotics are suitable candidates for more advanced laboratorial testing and also a promising route to bypass resistance mechanisms to fluoroquinolones.

Índice Geral

Índice de Figuras.....	v
Índice de Tabelas.....	ix
Abreviaturas.....	xi
I. INTRODUÇÃO.....	1
1. Fluoroquinolonas: Caracterização Geral.....	3
1.1 Gerações de Fluoroquinolonas.....	4
1.1.1 Propriedades Físico-químicas.....	6
1.2 Mecanismo de Ação.....	7
1.3 Mecanismos de Resistência.....	9
2. Estrutura Bacteriana.....	11
2.1 Membrana Externa de Bactérias Gram-negativas.....	12
2.2 Proteína F da Membrana Externa (OmpF).....	14
2.3 Lípidos Membranares na Ação dos Agentes Antimicrobianos.....	15
3. Complexos Metálicos das Fluoroquinolonas.....	17
3.1 Complexos Ternários de Cobre(II).....	18
3.1.1 Descrição da Estrutura Cristalina.....	20
3.2 Atividade Antibacteriana dos Complexos Metálicos das FQs.....	23
4. Técnicas Utilizadas.....	25
4.1 Lipossomas como Modelo de Membranas Biológicas.....	25
4.1.1 Classificação e Propriedades Físico-químicas.....	26
4.1.2 Preparação de Lipossomas.....	27
4.1.3 Sistemas Lipossômicos.....	29
4.2 Espectroscopia de Fluorescência.....	30
4.2.1 Fenômeno de Fluorescência.....	32
4.2.2 Medições Espectroscópicas.....	34
4.2.2.1 Fluorescência em Modo Estacionário.....	34
4.2.2.2 Fluorescência Resolvida no Tempo.....	35
4.2.2.3 Dados de Fluorescência Resolvida no Tempo.....	38
4.2.2.4 Fluorescência em Modo Estacionário <i>versus</i> Fluorescência Resolvida no Tempo.....	39
4.2.3 Extinção de Fluorescência.....	39

4.2.3.1 Agentes de extinção de Fluorescência.....	40
4.2.3.2 Extinção de Fluorescência Dinâmica.....	41
4.2.4 Anisotropia de Fluorescência.....	43
4.2.4.1 Princípio de Excitação Foseletiva de Fluoróforos.....	43
4.2.4.2 Despolarização da Fluorescência Emitida.....	44
4.2.4.3 Medidas de Anisotropia de Fluorescência.....	45
4.2.4.4 Sondas de Anisotropia de Fluorescência.....	46
4.2.5 Efeito de Filtro Interno no Espectro de Fluorescência.....	47
4.3 Coeficiente de Partição.....	48
4.3.1 Determinação através de Fluorescência em Modo Estacionário.....	49
5. Objetivos.....	50
II. EXECUÇÃO EXPERIMENTAL.....	51
1. Reagentes e Soluções.....	53
2. Instrumentação.....	54
3. Preparação de Metaloantibióticos em Solução.....	55
4. Preparação de Lipossomas.....	55
5. Condições Experimentais Usadas.....	56
6. Coeficientes de Partição por Fluorescência em Modo Estacionário.....	57
7. Estudos de Localização Membranar.....	58
7.1 Extinção de Fluorescência por Fluorescência Resolvida no Tempo.....	58
7.2 Anisotropia de Fluorescência por Fluorescência em Modo Estacionário.....	58
III. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
1. Coeficientes de Partição.....	63
1.1 Caracterização Espectroscópica UV-Visível.....	64
1.2 Determinação do Coeficiente de Partição por Fluorescência em Modo Estacionário.....	66
1.3 Conclusões.....	74
2. Estudos de Localização Membranar.....	75
2.1 Extinção de Fluorescência por Fluorescência Resolvida no Tempo.....	76
2.2 Anisotropia de Fluorescência por Fluorescência em Modo Estacionário.....	80
2.3 Conclusões.....	86
IV. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	89

1.1 Considerações Finais.....	91
1.2 Perspetivas Futuras.....	93
V. REFERÊNCIAS.....	95

Índice de Figuras

Figura 1. Estrutura química do núcleo base das fluoroquinolonas.....	3
Figura 2. Estrutura química de FQs de gerações diferentes: Ciprofloxacina (cpx) – 2ª geração, Levofloxacina (lvx) – 3ª geração e Moxifloxacina (mxfx) – 4ª geração.....	5
Figura 3. Equilíbrio protolítico da Norfloxacina (nfx). (19).....	6
Figura 4. Ligação da FQ à topoisomerase IV através de um íon Mg^{2+} coordenado (laranja), o qual se liga a um resíduo de serina e a um resíduo de ácido glutâmico pela formação de pontes de hidrogénio através de moléculas de água (azul).....	8
Figura 5. Mecanismos de resistência associados com a modificação de porinas. As moléculas de FQs e as porinas triméricas estão representadas por círculos azuis e por cilindros rosa, respetivamente. A grossura das setas retas reflete o nível de penetração das FQs através dos canais porínicos. As setas curvadas ilustram a falha da captura que pode ocorrer por: i) diminuição na expressão do tipo de porina necessária, ii) restrição do canal porínico, iii) troca de uma porina por outra ou iv) canal bloqueado, respetivamente. (Adaptada de (32)).....	10
Figura 6. Parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, respetivamente. (Adaptada de (44)).....	12
Figura 7. Estrutura do trímero da OmpF de <i>E. coli</i> . A posição dos Loops 2 e 3 em cada monómero são mostrados em azul e laranja, respetivamente. Organização das vistas da OmpF: A – o trímero funcional mostrado a partir do topo, B – o monómero é mostrado de lado e C – representação da zona de constrição do canal. (45).....	14
Figura 8. Desenho ilustrativo do tipo de rearranjo dos lípidos que pode ocorrer devido à ligação de certos agentes antimicrobianos catiónicos. O aglomerado de lípidos aniónicos (grupos de cabeça roxa) num domínio separado ocorre como consequência da ligação do agente antimicrobiano. Isto provoca um rearranjo dos lípidos à volta do domínio, deixando defeitos na membrana e no recrutamento de lípidos aniónicos de outros locais da membrana onde podem ser necessários para a sua função. (43).....	16

Figura 9. Representação esquemática da geometria piramidal quadrangular ligeiramente distorcida do centro $\{CuN_2O_3\}$. (4).....	20
Figura 10. Representação esquemática das estruturas cristalinas dos complexos ternários de FQs de segunda geração: (A) $[Cu(nfx)(phen)(H_2O)](NO_3) \cdot 3H_2O$, (B) $[Cu(cpx)(phen)](NO_3) \cdot 4H_2O$, (C) $[Cu(erx)(phen)(H_2O)](NO_3) \cdot 2H_2O$, (D) $[Cu(ofx)(phen)(H_2O)](NO_3) \cdot 2H_2O$ e (E) $[Cu(lmx)(phen)(NO_3)] \cdot 5H_2O$. (4).....	21
Figura 11. Representação esquemática do polímero de coordenação (cadeia) 1D de $[Cu(cpx)(phen)]^+$, formado na estrutura cristalina de Cu-cpx-phen. (4).....	22
Figura 12. Representação esquemática da estrutura cristalina do complexo catiónico $[Cu(lvx)(phen)(H_2O)](NO_3) \cdot 2H_2O$ (Cu-lvx-phen). (4).....	23
Figura 13. Classificação de lipossomas de acordo com o seu número de bicamadas e respetivo tamanho.....	26
Figura 14. Esquema das fases termodinâmicas das bicamadas lipídicas, fase gel e fase fluída, respetivamente.....	27
Figura 15. Representação esquemática da preparação de MLV's pelo método de hidratação do filme lipídico. [A] – Dissolução dos lípidos num solvente orgânico adequado; [B] – Formação do filme lipídico nas paredes do balão, por evaporação do solvente orgânico; [C] – Hidratação do filme lipídico por adição de solução aquosa; [D] – Agitação e obtenção de MLV's; [E] – LUV's obtidas por extrusão. (Adaptada de www.avantilipids.com/).....	28
Figura 16. Estrutura molecular predominante dos principais fosfolípidos encontrados para E. coli: [A] – PE, [B] – PG e [C] – CL. (Adaptada de www.avantilipids.com/).....	30
Figura 17. Espectro eletromagnético que se estende desde radiação de baixa frequência (micro-ondas) até radiação com elevadas frequências (Raios-X) e respetivos efeitos resultantes da sua interação com a matéria. (Adaptada de http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/mod3.html).....	32
Figura 18. Forma típica do diagrama de Jablonski. (Adaptada de (109)).....	33

Figura 19. Diagrama esquemático de um espectrofluorímetro. (Adaptada de (109)).....	35
Figura 20. Método TCSPC. Este baseia-se na detecção de tempos de chegada de fótons individuais após a excitação da amostra. A produção de um pulso de luz inicia o sistema eletrônico de contagem (TAC) que é interrompido quando o fóton emitido pela amostra atinge o detetor.....	36
Figura 21. Esquema eletrônico para o método TCSPC. (Adaptada de (109)).....	37
Figura 22. Acessibilidade do fluoróforo ao agente de extinção solúvel em água. (Adaptada de (109)).....	40
Figura 23. Distribuição de fluoróforos imóveis no estado excitado segundo o eixo do z. (Adaptada de (109)).....	44
Figura 24. Diagrama esquemático da medida de anisotropia de fluorescência. (Adaptada de (109)).....	45
Figura 25. Estrutura química das sondas [A] – DPH e [B] – TMA-DPH.....	47
Figura 26. Espectro de absorção das soluções de [Cu(II)/lvx/phen] em tampão HEPES (pH 7,4) com concentrações crescentes de complexo (0.99, 1.485, 2.475, 4.95, 9.9, 15.84 e 19.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$).....	64
Figura 27. Espectros de emissão de fluorescência obtidos por fluorescência em modo estacionário para os metaloantibióticos: [A] – Cu(II)/cpx/phen (5 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; 1:1:1), [B] – Cu(II)/lvx/phen (9 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; 1:1:1) e [C] – Cu(II)/mxfx/phen (9 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; 1:1:1). O espectro de emissão de fluorescência da solução de metaloantibiótico na ausência (0) e presença (1-9) de LUV's de extrato total de <i>E. coli</i> , com comprimento de onda de excitação de 350 nm para o complexo [Cu(II)/lvx/phen] e de 290 nm para os complexos [Cu(II)/cpx/phen] e [Cu(II)/mxfx/phen]. Cada espectro corresponde à média de cinco medições.....	67
Figura 28. Ajuste não linear dos dados espectrofotométricos (equação 9) obtidos ao comprimento máximo de emissão de [A] – [Cu(II)/cpx/phen] a 414 nm, [B] –	

[Cu(II)/lvx/phen] a 458 nm e [C] – [Cu(II)/mxfx/phen] a 468 nm, em concentrações crescentes de LUV's de extrato total de *E. coli*.....68

Figura 29. Esquema da dissociação de uma FQ artificial (CNV-8912). (128).....72

Figura 30. Representação do tratamento de dados no programa DAS6 Analysis do decaimento de intensidade de fluorescência em espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo do complexo [Cu(II)/lvx/phen] na presença de LUV's de extrato total de *E. coli* (~250 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$). A linha azul à esquerda representa o LUDOX e a linha vermelha do lado direito representa o perfil de decaimento ajustado com uma função de uma exponencial (linha verde) para o intervalo de canais selecionado.....77

Figura 31. Ajuste linear dos dados do tempo de vida de fluorescência (equação 5) obtidos ao comprimento máximo de emissão de [A] – [Cu(II)/cpx/phen] a 414 nm, [B] – [Cu(II)/lvx/phen] a 458 nm e [C] – [Cu(II)/mxfx/phen] a 468 nm, em concentrações crescentes de KI em tampão HEPES (pH 7.4). As intensidades de fluorescência foram obtidas por um LED com excitação a 290 nm.....78

Figura 32. Variação da anisotropia de fluorescência, em função da temperatura, do DPH (grupo 1) e TMA-DPH (grupo 2) em lipossomas de extrato total de *E. coli* na ausência (quadrados cinzentos) e na presença de metaloantibiótico (círculos castanhos): [A] – [Cu(II)/cpx/phen], [B] – [Cu(II)/lvx/phen] e [C] – [Cu(II)/mxfx/phen].....82

Índice de Tabelas

Tabela 1. Comparação entre as gerações de algumas fluoroquinolonas relativamente ao seu espectro de atividade e modo de administração. (Adaptada de (12)).....	4
Tabela 2. Constantes de estabilidade dos complexos de Cu(II) determinados a 25°C e I = 0,1 M (NaCl). (4).....	19
Tabela 3. Concentração de metaloantibiótico e respetivos comprimentos de onda de excitação (λ_{exc}) e emissão (λ_{emi}) usados na determinação do coeficiente de partição e nos estudos de localização (extinção de fluorescência e anisotropia de fluorescência).....	57
Tabela 4. Bandas de absorção de UV-Vis características para as FQs e os respetivos metaloantibióticos. (4).....	65
Tabela 5. Coeficientes de partição obtidos para os metaloantibióticos da Ciprofloxacina, Levofloxacina e Moxifloxacina com LUVs de extrato total de <i>E. coli</i> , obtidos por fluorescência em modo estacionário, determinados a $\lambda_{em} = 414; 458$ e 468 nm, respetivamente, pela aplicação da equação 9.....	69
Tabela 6. Valores de pKa (média \pm desvio-padrão) (4) e rácio das espécies ião-dipolar/neutra.....	73
Tabela 7. Valores da constante de Stern-Volmer (k_{sv}) para os metaloantibióticos com iodeto na ausência e na presença de diferentes concentrações de LUVs de extrato total de <i>E. coli</i> (250, 500 e 750 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) através de espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo. As constantes foram obtidas por um LED com excitação a 290 nm e lidas ao comprimento de emissão máximo para cada metaloantibiótico.....	79
Tabela 8. Temperaturas de transição ($T_m/^\circ\text{C}$) reportadas para o sistema de Extrato total de <i>E. coli</i> (em tampão HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 0,1M), usando DPH e TMA-DPH por anisotropia de fluorescência por espectroscopia de fluorescência em modo estacionário. (41).....	83

Tabela 9. Valores da temperatura de transição de fase (T_m) de lipossomas de extrato total de *E. coli* com TMA-DPH incorporada obtidos através do ajuste não-linear dos dados de anisotropia de fluorescência estática da Figura 32 – [C2].....85

Abreviaturas

Abs – Absorvância
CL – Cardiolipina
cpx – Ciprofloxacina
DAP – Ácido Diaminopimérico
DLS – Dispersão Dinâmica de Luz
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DPH – 1,6-fenil-1,3,5-hexatrieno
E. coli – Escherichia coli
erx – Enrofloxacin
FDA – *Food and Drug Administration*
FQs – Fluoroquinolonas
IF – Intensidade de Fluorescência
 K_p – Coeficiente de Partição
 k_{sv} – Constante de Extinção de Stern-Volmer
Imx – Lomefloxacina
LPS – Lipopolissacarídeos
LUVs- Vesículas Unilamelares Grandes
lvx – Levofloxacina
MIC – Concentração Mínima Inibitória
MLVs – Vesículas Multilamelares Grandes
mxfx – Moxifloxacina
nfx – Norfloxacina
ofx – Ofloxacina
OmpC – Proteína C da Membrana Externa
OmpF – Proteína F da Membrana Externa
Phen – Fenantrolina
PE – Fosfatidiletalona
PG – Fosfatidilglicerol
SPR – Ressonância de Plasma de Superfície

spx – Sparfloxacina

SUVs – Vesículas Unilamelares Pequenas

τ – Tempo de vida

TAC – Conversor Tempo-Amplitude

TCSPC – Contagem de Fótons Únicos Correlacionados no Tempo

TFM – Tubo Fotomultiplicador

T_m – Temperatura de Transição

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

I. INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana aos antibióticos é uma das maiores ameaças à saúde pública do mundo moderno. As fluoroquinolonas (FQs) são uma família de agentes antibacterianos com um largo espectro de ação contra bactérias, especialmente Gram-negativas. O seu mecanismo de ação assenta na inibição de enzimas responsáveis pela replicação do DNA. A membrana externa das bactérias Gram-negativas (revestimento protetor da célula bacteriana) é o principal obstáculo à entrada das FQs e existem diferentes formas conhecidas do antibiótico atingir o espaço intracelular, nomeadamente através das proteínas transmembranares, as porinas, e/ou simplesmente por difusão através da membrana, um fator que está diretamente relacionado com as características hidro/lipofílicas dos antibióticos. A diminuição da permeabilidade membranar resultante, na maioria das vezes, da existência de mutações ao nível dos genes responsáveis pela expressão de porinas, constitui um dos principais mecanismos de resistência bacteriana a FQs. Uma estratégia para contornar a resistência bacteriana consiste na coordenação das FQs com cátions metálicos divalentes e 1,10-fenantrolina. Particularmente, estudos biológicos recentes demonstraram que o cátion cobre(II) forma complexos ternários estáveis com FQs e fenantrolina e que estes têm uma eficiência antimicrobiana comparável ou superior ao antibiótico na forma livre. Além disso, estudos biofísicos sugerem que o ataque direto das membranas bacterianas parece ser o foco central da sua captura, fenómeno que indica que estes complexos sejam bons candidatos para contornar a resistência bacteriana a FQs.

1. Fluoroquinolonas: Caracterização Geral

As fluoroquinolonas (FQs) são uma classe de antibióticos entre as mais bem-sucedidas da atualidade, frequentemente utilizadas contra bactérias Gram-positivas, e principalmente, Gram-negativas. (1-6) Para além do seu amplo espectro de ação, estes agentes antibacterianos são usados na prática clínica devido às suas propriedades farmacocinéticas e de biodisponibilidade melhoradas, aliadas a uma boa absorção oral e efeitos adversos relativamente limitados. (2,5,7,8) A sua atividade resulta na inibição de duas topoisomerases tipo II homólogas, DNA girase e DNA topoisomerase IV, enzimas que controlam a topologia do DNA e que são vitais para a função e replicação do cromossoma. (2,4,7) Como o próprio nome sugere, o principal fator químico que caracteriza as fluoroquinolonas é a presença de um átomo de flúor na sexta posição do esqueleto base das quinolonas, constituído por 4-oxo-1,8-naftiridina-3-carboxilo (Figura 1). (7,9-11) Adversamente, o uso excessivo e indevido das FQs levaram ao aparecimento de resistência bacteriana a esta classe de antibióticos, a qual se disseminou rapidamente em ambientes clínicos e ambientais, constituindo uma das maiores ameaças à saúde pública do mundo moderno. (1,8) A resistência microbiana aos antibióticos estimulou a necessidade de criar e modificar agentes antimicrobianos. (6,8) Neste contexto, o conceito de complexos metálicos como novos derivados das FQs, também designados de metaloantibióticos, tem sido uma estratégia a seguir para melhorar a atividade, reduzir os efeitos adversos e neutralizar a resistência bacteriana. (1,4-8)

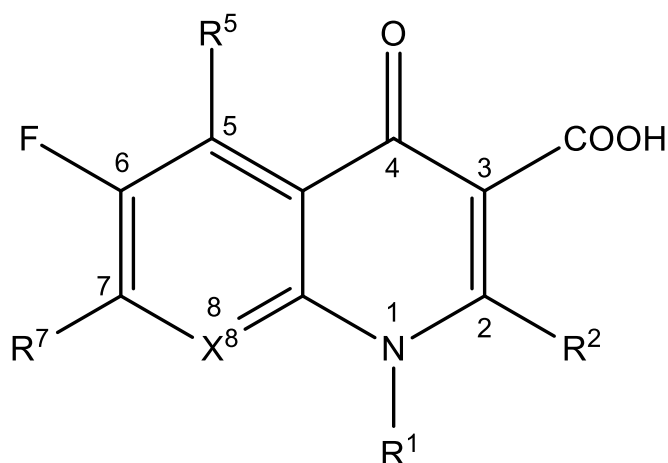


Figura 1. Estrutura química do núcleo base das fluoroquinolonas. A informação detalhada dos substituintes R¹-R⁷ e X⁸ pode ser encontrada no texto.

1.1 Gerações de Fluoroquinolonas

Este grupo de agentes antimicrobianos tem um longo historial no uso da prática clínica. (2) Devido à atividade limitada das primeiras quinolonas (p.e. Ácido Nalidíxico), várias alterações estruturais foram introduzidas ao seu núcleo base, conduzindo à sua classificação em termos de gerações (Tabela 1). (3,4,7,8,13,14) O seu desenvolvimento ao longo dos anos tem promovido uma ampla gama de aplicações, primeiro no tratamento de infeções causadas por bactérias Gram-negativas (primeira geração), e mais recentemente, novos derivados (segunda, terceira e quarta geração) têm sido desenvolvidos com uma atividade aumentada contra bactérias Gram-positivas, incluindo *Streptococcus pneumoniae*, um dos patógenos mais importantes responsável por infeções do trato respiratório, otite aguda e meningite. (2,3)

Tabela 1. Comparação entre as gerações de algumas fluoroquinolonas relativamente ao seu espectro de atividade e modo de administração. (Adaptada de (12))

GERAÇÃO	ANTIBIÓTICO	ATIVIDADE	ADMINISTRAÇÃO
PRIMEIRA	Ácido Nalidíxico	Gram -	Infeções urinárias
	Cinoxacina		
SEGUNDA	<u>Classe I</u>		
	Lomefloxacina	Gram -	Infeções urinárias
	Norfloxacina		
	Enrofloxacina		
	<u>Classe II</u>		Infeções urinárias graves
TERCEIRA	Ofloxacina	Gram -	Gastroenterites
	Ciprofloxacina	Gram + (moderada)	Infeções nosocomiais DST
	Levofloxacina	Gram -	Similar à segunda geração
	Sparfloxacina	Gram +	Pneumonias
QUARTA	Gatifloxacina		
	Moxifloxacina	Gram - Gram +	Infeções intra-abdominais
	Trovafloxacina	Anaeróbios estrictos	

As substituições químicas no núcleo das quinolonas foram feitas com base na relação estrutura-atividade de modo a aumentar o espectro de atividade e a potência das FQs. Verificou-se que o átomo de flúor na posição 6 e o grupo amina cíclica na posição 7 aumentam consideravelmente o espectro de ação das FQs. (4,7,9,11,15) Deste modo, certas características permanecem constantes ao longo de todas as gerações e pensa-se que são necessárias para a atividade antibacteriana. A base estrutural das fluoroquinolonas é constituída por um núcleo aromático bicíclico (Figura 1) formado por um anel piridínico fundido com outro anel aromático. Este contém, em muitos casos, um átomo de hidrogénio na posição 8, mas também pode conter um átomo de azoto ou mesmo um átomo de flúor, como é o caso da Sparfloxacina (spx) ou Lomefloxacina (lmx). Tanto o ácido carboxílico na posição 3 e a cetona no carbono 4 são geralmente necessários para a atividade antimicrobiana, bem como o grupo R¹ substituído do azoto da posição 1. (4,16) Na maior parte das fluoroquinolonas de gerações mais recentes o grupo R⁷ corresponde a uma diamina cíclica, com 5 ou 6 membros, ligada através de um dos seus azotos à posição 7, exceto na Moxifloxacina (mxfx) o qual corresponde a um anel diazabicyclonilo. (1,4,17) Muitas fluoroquinolonas não são substituídas no carbono 5 (R⁵=H), mas compostos recentes têm pequenos substituintes como grupos etilo ou metilo nesta posição. As substituições em R² são geralmente prejudiciais, no entanto já foram descritas algumas exceções (p.e. a Prulifloxacina tem um substituinte R² que forma um anel com R¹). (4,18) A Figura 2 mostra a estrutura química de uma fluoroquinolona (FQ) da segunda, terceira e quarta geração, respetivamente.

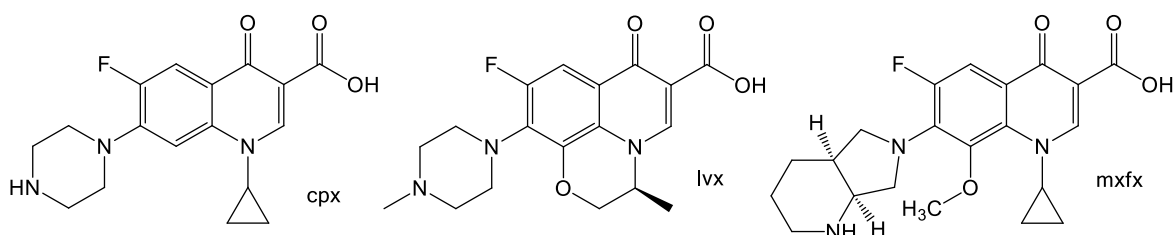


Figura 2. Estrutura química de FQs de gerações diferentes: Ciprofloxacina (cpx) – 2^a geração, Levofloxacina (lvx) – 3^a geração e Moxifloxacina (mxfx) – 4^a geração.

1.1.1 Propriedades Físico-químicas

As FQs têm dois grupos ionizáveis relevantes, no geral, um grupo piperazinil básico na posição 7 e um ácido carboxílico na posição 3 do núcleo das quinolonas, o que lhes confere um carácter anfotérico (Figura 2). (1,4-8,17,19) O comportamento farmacológico das FQs em solução é significativamente influenciado pelas suas propriedades físico-químicas, em particular pelo seu grau de ionização. (19) Desta forma, dependendo do pH do meio, podem surgir sob a forma catiónica, aniónica e ião-dipolar/neutra. (15) A um valor de pH baixo estes grupos ionizáveis estão protonados (H_2L), fornecendo à molécula uma carga global positiva. Enquanto a um valor de pH alto estão ambos desprotonados (L), visto que o grupo amina é uma base na forma livre e o grupo ácido carboxílico rapidamente se transforma em ião carboxilato fornecendo uma carga global negativa. (4,6,8) O grupo ácido carboxílico é normalmente um ácido mais forte do que o grupo amina distal, portanto a forma neutra rearranja-se espontaneamente na forma de ião-dipolar, cujos valores de pK_{a1} e pK_{a2} para as FQs variam entre 5,5-6,3 e 7,6-9,3, respetivamente, como descrito extensivamente na literatura. (7,8,18,20-24) Desta forma, o equilíbrio protolítico das FQs pode ser expresso como esquematizado na Figura 3. (19) O valor de pK_{a1} nas FQs é geralmente maior do que o observado para os respetivos ácidos carboxílicos, um facto que normalmente está associado à existência de uma ligação de hidrogénio intramolecular entre o ácido carboxílico e a cetona da posição 4, que resulta na estabilização de espécies protonadas. O valor de pK_{a2} é normalmente sensível à substituição no anel de piperazina ou à substituição deste anel por um anel de diazabicyclonilo (mxfx). (4,6,8,19) Assim, ao valor do pH fisiológico (7,4), é a forma de ião-dipolar/neutra que está presente em maior concentração, conferindo uma solubilidade mínima às FQs a pH neutro. (15,19) Estas diferentes formas de protonação constituem ainda um parâmetro importante para a síntese de complexos metálicos, uma vez que as FQs atuam como ligandos na forma desprotonada (FQ^-) em condições básicas, e como ião dipolar (FQH^\pm) em condições neutras, ligeiramente básicas ou ligeiramente ácidas. (25)

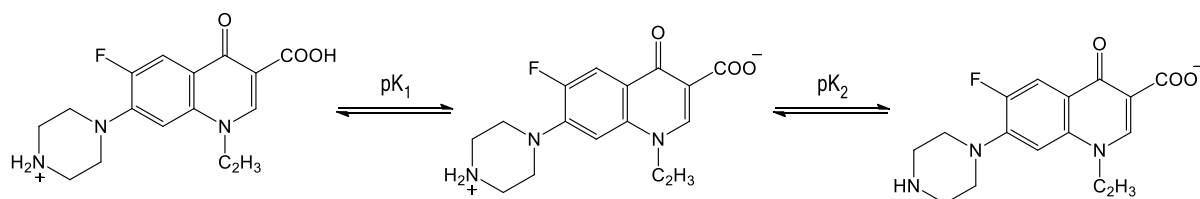


Figura 3. Equilíbrio protolítico da Norfloxacinina (nfx). (19)

1.2 Mecanismo de Ação

As FQs atuam intracelularmente e o seu mecanismo de ação baseia-se na inibição da divisão celular através da estabilização da clivagem reversível de complexos formados por DNA e DNA girase ou topoisomerase IV, as enzimas responsáveis pela replicação do DNA. (4,5,7,8,17) Quer nos procariontes, quer nos eucariontes, o DNA existe como dupla hélice. Contudo, nas bactérias pode ocorrer uma torção adicional da dupla hélice sobre si própria, processo conhecido como *supercoiling*, permitindo que o DNA cromossomal exista numa forma muito compacta, armazenando uma grande quantidade de informação genética. O *supercoiling* pode ser positivo ou negativo, de acordo com a direção no qual a torção ocorre. O grau de DNA *supercoiled* não é fixo e existe uma remodelação contínua na topologia do DNA bacteriano em resposta a fatores ambientais e celulares. As topoisomerases tipo I e II trabalham de modo oposto na torção da dupla hélice de modo a controlar o nível de torção, a topoisomerase I reduz o número de *supercoils* negativos, enquanto a topoisomerase II introduz *supercoils* negativos. (26,27)

A DNA girase e a topoisomerase IV são ambas topoisomerase tipo II heterotetraméricas que têm uma ação homóloga mas com subtis diferenças, pois embora ambas relaxem o DNA *supercoiled* positivo, só a DNA girase pode introduzir *supercoiling* negativo no DNA relaxado. A topoisomerase IV tem ainda uma atividade de separação na replicação de DNA, permitindo a segregação individualizada de material genético em cada uma das células filhas, completando o ciclo de divisão celular. (27,28)

Os principais alvos das fluoroquinolonas variam entre as diferentes espécies bacterianas e fluoroquinolonas específicas; contudo, o alvo chave em bactérias Gram-negativas é a DNA girase enquanto que em microrganismos Gram-positivos, o alvo preferencial é a topoisomerase IV. (16,26) A ação das fluoroquinolonas resulta na diminuição da replicação do DNA (a baixas concentrações) e morte celular (em concentrações letais). Numa situação normal, uma topoisomerase II liga-se covalentemente ao DNA, formando um complexo enzima-DNA que provoca uma quebra transitória na dupla hélice e restaura um novo segmento de DNA. Quando uma fluoroquinolona está presente, o complexo é alterado para um complexo fármaco-enzima-DNA (também conhecido como complexo ternário), no qual a topoisomerase tipo II fica bloqueada com o DNA quebrado ligado. (26,27) Existem várias teorias sobre o modo de ação das FQs, onde o modelo mais recente sugere que a base da interação da fluoroquinolona com a topoisomerase IV ocorre através de um íon de Mg^{2+} complexado (Figura 4) (29,30). Este modelo sugere que o íon é coordenado pelos substituintes cetona (C3) e carboxilato (C4) do esqueleto das

Novas Estratégias para Entender o Sistema de Influxo de Antibióticos e a Resistência Antimicrobiana a Nível Molecular

fluoroquinolonas e por moléculas de água vizinhas. Estas moléculas de água, por sua vez, formam pontes de hidrogénio com resíduos de serina e com aminoácidos ácidos conservados na enzima. Contudo, ainda não se sabe ao certo se a influência do ião Mg^{2+} é devido ao seu efeito estabilizador sobre a topologia do DNA ou se é devido à sua capacidade de coordenar com os grupos cetona e carboxilato das FQs. (26,29)

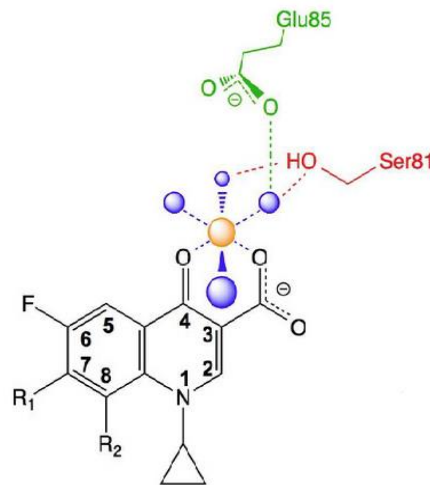


Figura 4. Ligação da FQ à topoisomerase IV através de um ião Mg^{2+} coordenado (laranja), o qual se liga a um resíduo de serina e a um resíduo de ácido glutâmico pela formação de pontes de hidrogénio através de moléculas de água (azul).

O modo como as FQs acedem ao local onde vão atuar é determinante para a eficácia de fármacos, como as fluoroquinolonas, que têm alvos intracelulares. (3,31) No caso das bactérias Gram-negativas, a membrana externa (revestimento protetor da célula bacteriana) é a principal barreira de permeabilidade celular para as FQs. (2,5,6) Assim, as FQs têm de penetrar esta estrutura e três vias diferentes são conhecidas: a via hidrofóbica, a via porina e a via autopromovida usada por compostos catiónicos. (5,6) Algumas FQs são capazes de se difundirem diretamente através das bicamadas lipídicas (via hidrofóbica), devido ao seu carácter lipofílico e à sua forma não carregada em condições fisiológicas. (5) Por outro lado, estudos com diferentes estirpes bacterianas destacam o envolvimento de algumas porinas desta membrana, mais concretamente da OmpF, que parece ter um papel importante na entrada das fluoroquinolonas. Porém, ainda permanece desconhecido se a entrada do antibiótico é realizada através da interface lípido/proteína ou do canal porínico. (1,2,3,32) Estas diferentes vias parecem estar diretamente relacionadas com as propriedades hidro/lipofílicas das FQs. (2,6) Em todos os casos, a interação entre o antibiótico e a bicamada lipídica é, provavelmente, o primeiro processo envolvido na passagem através da membrana. (5)

1.3 Mecanismos de Resistência

O uso excessivo e incorreto de antibióticos promoveu adaptações bacterianas comprometendo imensamente a eficácia destes fármacos. (1,4,5,7,33,34) Na base das adaptações bacterianas está o surgimento de diferentes mecanismos de resistência que ocorrem a um ritmo elevado. (1,5,7,13,16). Os dois principais mecanismos de resistência bacterianos desenvolvidos contra a ação das FQs são a mudança das moléculas alvo (topoisomerases) e a redução da concentração intracelular de antibiótico, através da diminuição da permeabilidade da membrana ou da existência de bombas de efluxo. (1,5,31,33,34) As alterações nas topoisomerases ocorrem devido a uma mutação em um ou mais genes que resultam em substituições de aminoácidos, nomeadamente de serina e/ou ácido glutâmico, que alteram a estrutura da proteína alvo e, conseqüentemente, a afinidade da ligação da FQ à enzima (Figura 4). (31,32) Nas bactérias Gram-negativas, a membrana externa é o maior obstáculo à entrada de antibióticos, particularmente para as moléculas hidrofílicas, cuja entrada é governada por proteínas, as porinas. (2,3,31,32,35) Mutações pontuais que comprometem a afinidade da porina ao antibiótico, ou a expressão de uma porina diferente que bloqueia a translocação do agente antimicrobiano, são manifestações usualmente observadas em diversas espécies resistentes (Figura 5). (3,31-36) As bombas de efluxo são também capazes de remover ativamente fluoroquinolonas a partir da célula bacteriana. (31,33) Como a via de entrada através da membrana é o primeiro passo envolvido na atividade das FQs, é neste sentido que vários estudos visam compreender e contornar a resistência bacteriana às FQs. (1,2,4-7,26,37)

Novas Estratégias para Entender o Sistema de Influxo de Antibióticos e a Resistência Antimicrobiana a Nível Molecular

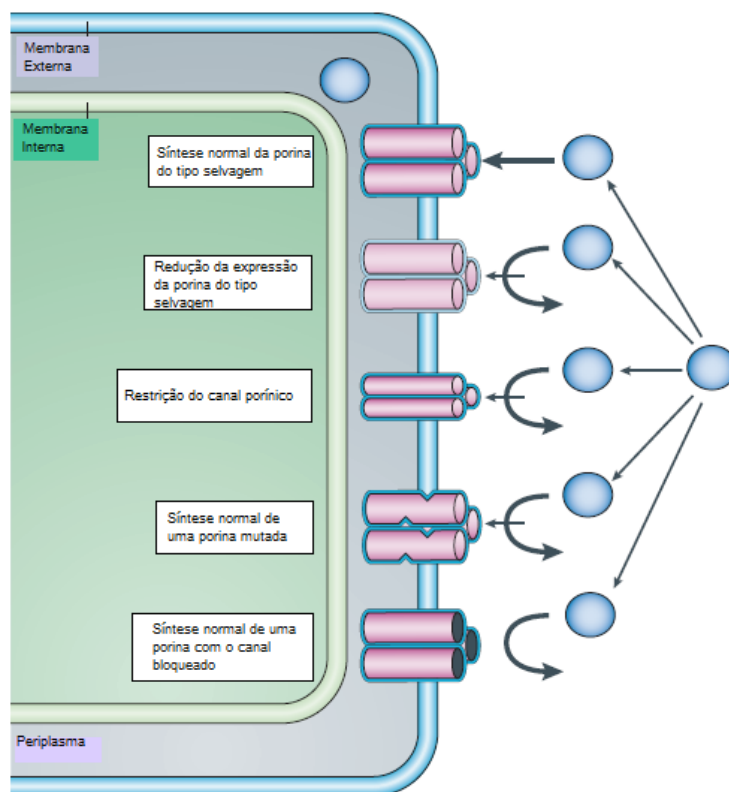


Figura 5. Mecanismos de resistência associados com a modificação de porinas. As moléculas de FQs e as porinas triméricas estão representadas por círculos azuis e por cilindros rosa, respectivamente. A grossura das setas retas reflete o nível de penetração das FQs através dos canais porínicos. As setas curvas ilustram a falha da captura que pode ocorrer por: i) diminuição na expressão do tipo de porina necessária, ii) restrição do canal porínico, iii) troca de uma porina por outra ou iv) canal bloqueado, respectivamente. (Adaptada de (32))

2. Estrutura Bacteriana

As bactérias são seres procariotas e, apesar de serem morfologicamente mais simples que as células eucarióticas, possuem uma organização celular muito particular. Em termos de padrão da estrutura interna, o DNA encontra-se na forma de dupla hélice circular ocupando uma posição aproximadamente central, região conhecida como nucleóide. Estas células são também desprovidas de organelos, contendo apenas a maquinaria necessária para proceder à síntese proteica. Contudo, todas estas células possuem membrana plasmática e parede celular, que desempenham um papel crucial na sobrevivência dos procariotas. (38-40)

A membrana plasmática envolve completamente o citoplasma, separando o meio intracelular do meio extracelular. (39) Está organizada na forma de bicamada lipídica incorporando uma enorme diversidade de proteínas periféricas e transmembranares. (38,39,41) Esta membrana é também uma barreira altamente seletiva, permitindo à célula concentrar metabolitos específicos e excretar resíduos metabólicos. (38) Aderente à membrana plasmática encontra-se a parede celular. A principal função da parede é de proteção mecânica ao *stress* osmótico uma vez que contém um alto conteúdo de polissacarídeos e péptidos, que conferem rigidez estrutural à célula. (38-40) O principal componente da parede bacteriana é o peptidoglicano, um polissacarídeo composto por dois derivados de açúcar – N-acetilglucosamina e ácido N-acetilmurâmico – e poucos aminoácidos, incluindo L-alanina, D-alanina, D-ácido glutâmico e, ainda, lisina ou ácido diaminopimélico (DAP). (38,42) Todavia, existem duas estruturas gerais para a organização da parede celular que permitem classificar as bactérias em Gram-positivas e em Gram-negativas. A maior diferença estrutural entre ambas as classes bacterianas assenta no facto de as Gram-positivas terem apenas a membrana plasmática revestida por uma espessa camada de peptidoglicano no folheto externo (~90%), enquanto as bactérias Gram-negativas, além da membrana plasmática (revestida por uma fina camada de peptidoglicano, ~10%) possuem ainda uma membrana externa adicional (Figura 6). (38,39,42,43)

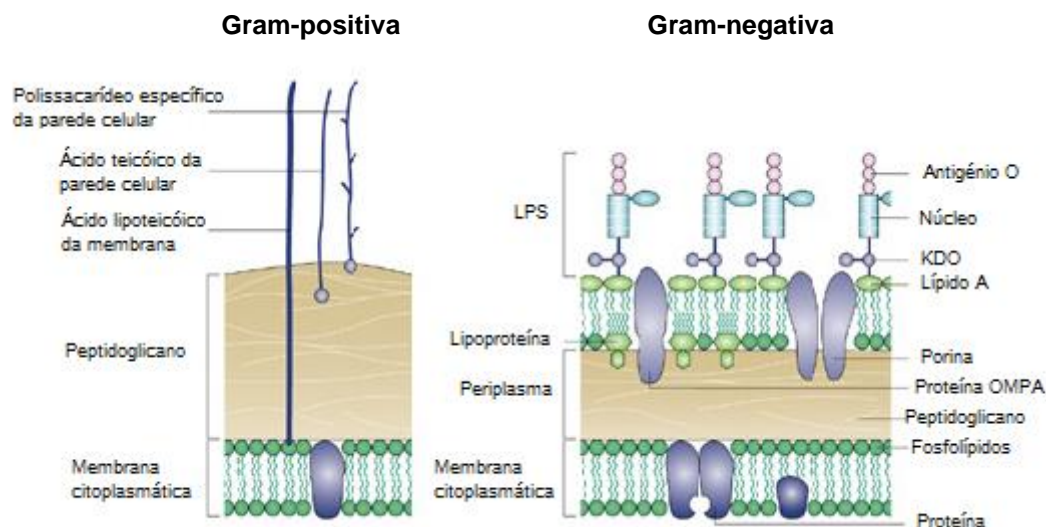


Figura 6. Parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, respectivamente. (Adaptada de (44))

Uma vez que a membrana externa das bactérias Gram-negativas constitui a primeira linha de defesa destas bactérias para o acesso das FQs até ao seu alvo (2,3,6,36), é nesta estrutura que reside o enfoque deste estudo.

2.1 Membrana Externa de Bactérias Gram-negativas

As bactérias Gram-negativas, como a *Escherichia coli* (*E. coli*), estão envolvidas por duas membranas concêntricas na forma de bicamada lipídica. Ambas as membranas contêm proteínas que permitem a passagem de matéria e informação. Ainda assim, as duas membranas diferem acentuadamente em relação à composição e função. A componente lipídica da membrana interna (plasmática) é composta exclusivamente por fosfolípidos, principalmente fosfatidiletalona (PE) (70–80%), fosfatidilglicerol (PG) e cardiolipina (CL), igualmente distribuídos entre o folheto interno e externo. (38,45,46) Por sua vez, a membrana externa é altamente assimétrica, com o seu folheto interno apresentando uma composição lipídica semelhante à da membrana plasmática e o folheto externo composto

por uma percentagem significativa de lipopolissacarídeos (LPS), ou lipooligossacarídeos no caso de *Neisseriae*. (43,46,47)

Na porção do LPS destacam-se três regiões distintas, o lípido A, correspondente à porção mais hidrofóbica e responsável pela ancoragem ao folheto externo da membrana externa, seguido de uma cadeia polissacarídea que se estende para o exterior da célula e que liga ao antígeno O (Figura 6). (38,48) O LPS desempenha um papel crucial na defesa da célula bacteriana, uma vez que evita a internalização de antibióticos e outros agentes tóxicos através da formação de uma estrutura mais rígida causada por interações entre moléculas de LPS adjacentes, reduzindo a permeabilidade celular. (40,45,49) Além disso, o LPS está associado à virulência destas bactérias, originando efeitos biológicos que resultam na amplificação das reações inflamatórias, nomeadamente pela porção de lípido A e, por isso, esta componente é muitas vezes referida como endotoxina. (38,48)

No que diz respeito às funcionalidades das membranas, a principal diferença é que a membrana externa, devido à presença de proteínas formadoras de poros (porinas), é consideravelmente mais permeável que a membrana plasmática. (2,3,33,42,45,46) É sabido que a membrana externa de uma bactéria Gram-negativa possui mais de 10^5 porinas. (45,46) As porinas permitem a penetração passiva de moléculas hidrofílicas de baixo peso molecular e, de acordo com sua seletividade para solutos, podem ser classificadas como gerais ou específicas. (33,38,45) As porinas gerais permitem a passagem de pequenas moléculas hidrofílicas, embora elas apresentem uma ligeira seletividade para a carga e tamanho do soluto: a OmpF e OmpC mostram uma ligeira preferência para catiões, com a OmpF a permitir a permeação de solutos ligeiramente maiores que OmpC, enquanto PhoE apresenta maior seletividade para aniões. (33,45) Em contraste, porinas específicas contêm locais de ligação só para um ou um pequeno grupo de substâncias estruturalmente relacionadas. (38,45)

A membrana externa é assim um sistema complexo devido à sua composição lipídica e proteínas membranares. (5) Algumas FQs necessitam de porinas para alcançar o seu alvo, particularmente da OmpF. (2-5)

2.2 Proteína F da Membrana Externa (OmpF)

A proteína F da membrana externa (OmpF) é um homotrímero e cada canal da sua estrutura permite a difusão de pequenas moléculas hidrofílicas, preferencialmente catiónicas, com um tamanho inferior a 600 Da. (45,46) Cada canal da OmpF tem cerca de 12 Å de diâmetro e 340 aminoácidos organizados numa estrutura em forma de barril. Cada barril é constituído por 16 folhas β pregueadas antiparalelas, ligadas entre si por *loops*, e com uma orientação entre 30 e 60° relativamente ao eixo do trímero (Figura 7). (35,43,45,46)

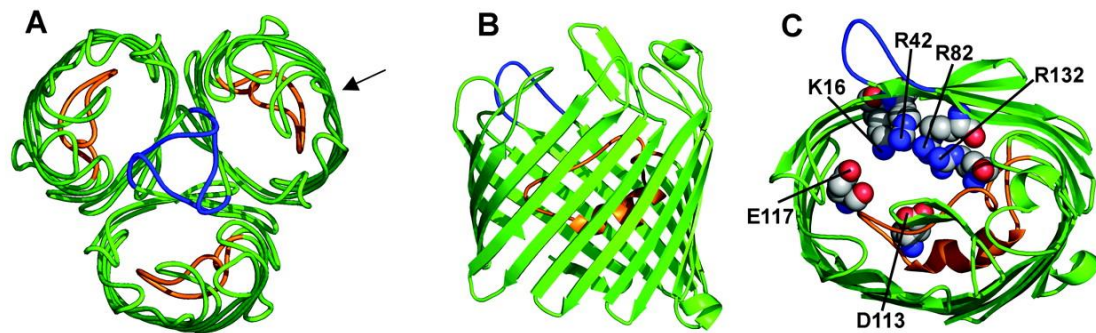


Figura 7. Estrutura do trímero da OmpF de *E. coli*. A posição dos *Loops* 2 e 3 em cada monómero são mostrados em azul e laranja, respetivamente. Organização das vistas da OmpF: A – o trímero funcional mostrado a partir do topo, B – o monómero é mostrado de lado e C – representação da zona de constrição do canal. (45)

A formação do trímero é atribuída às interações hidrofóbicas e polares das folhas β de cada monómero. O *Loop* 2, orientado para o exterior do canal, medeia a interação entre os monómeros, contribuindo para a sua estabilização (Figura 7A). O tamanho do canal é essencialmente determinado pelo *Loop* 3, uma vez que este se encontra dobrado para o interior do canal, originando uma zona de constrição (Figura 7A). (45) A seletividade da porina tem sido atribuída essencialmente à natureza dos resíduos da zona de constrição, nomeadamente à natureza negativa dos aminoácidos de aspartato (D113) e glutamato (E117) (Figura 7C). (50,51)

Diversos estudos mostram a existência de uma forte interação entre fluoroquinolona/OmpF e que esta interação aumenta a partir da primeira geração de FQs, indicando que existe uma correlação estabelecida entre a afinidade destes antibióticos à OmpF e a sua hidrofiliidade. (2,52-55) Uma elucidação molecular atribui este facto à dependência do pH, admitindo que a molécula de FQ penetra perfeitamente no poro na forma de ião-dipolar, interagindo simultaneamente com os resíduos carregados negativamente do *Loop* 3 e com

os resíduos carregados positivamente da parede do barril. (56) Contudo, como já referido anteriormente, mutações nas porinas são uma das maiores causas de resistência bacteriana. Devido ao conhecimento deste mecanismo de resistência, as interações fármaco-lípido assumiram assim uma grande importância na estratégia de desenvolvimento de novos antibióticos nos últimos anos. (1,5,6,43)

2.3 Lípidos Membranares na Ação dos Agentes Antimicrobianos

Uma das principais tendências na procura de novos antibióticos é o desenvolvimento de fármacos que tenham como alvo específico as membranas bacterianas, desestabilizando-as ou induzindo a formação de domínios membranares. Na base deste conceito está, principalmente, a diferente composição lipídica entre a membrana bacteriana e eucariota. Enquanto o folheto externo da membrana plasmática de mamíferos consiste, quase exclusivamente, em fosfolípidos neutros, a bacteriana tem um elevado teor de fosfolípidos carregados negativamente (PG e CL), o que é um fator preponderante para a afinidade de vários tipos de moléculas antibacterianas. (1,6) É com a exposição a estes lípidos carregados negativamente, em conjunto com o LPS, que a membrana externa bacteriana fornece seletividade a agentes antimicrobianos catiónicos. (11,43,57)

Existem vários mecanismos de ação descritos para os agentes antibacterianos catiónicos. Os peptídeos antimicrobianos, por exemplo, são uma classe de compostos que podem exibir dois mecanismos de ação diferentes. Alguns peptídeos têm demonstrado a produção de perturbações membranares significativas, pela formação de domínios específicos lípido-peptídeo, segregação lateral de fase do ião dipolar a partir de fosfolípidos aniónicos, e até mesmo a indução de fases não-lamelares a condições fisiológicas relevantes. (43,58-61) Por outro lado, um mecanismo que tem sido reportado, tendo em conta a atividade biológica exibida por alguns destes peptídeos antimicrobianos, é o resultado do desequilíbrio do rácio de massa pela preferência da ligação a um domínio lipídico particular, produzindo localmente uma desproporção de massa que dirige a translocação do peptídeo através do aumento de curvatura da membrana nesse local. Este mecanismo é

comummente designado como modelo *sinking raft* e é responsável pela formação de poros transientes, após a dissipação do desequilíbrio de massa no folheto membranar induzido pelo péptido. (62,63)

Obviamente que a natureza química dos agentes antibacterianos é bastante diversa e não é possível prever se os seus mecanismos de ação serão similares. No entanto, nos últimos anos o mecanismo basilar para o rompimento da barreira de permeabilidade das membranas, baseia-se na formação de domínios lipídicos membranares. (43) Este envolve a separação dos componentes lipídicos induzida por um agente antimicrobiano catiónico, resultando na formação de aglomerados de lípidos aniônicos e possivelmente originando defeitos nas fronteiras entre os domínios lipídicos, reduzindo eficientemente a probabilidade destes se reorganizarem (Figura 8). (43,64-66) Contudo, estes domínios membranares não podem por si só conduzir à toxicidade, pois acredita-se que os domínios estão comumente presentes nas membranas biológicas. Sugere-se que devido à grande heterogeneidade nas interfaces dos domínios biológicos membranares, estes são estabilizados através da concentração de outras moléculas na interface do domínio para reduzir a tensão da membrana. Porém, quando os domínios são formados como consequência da adição de um agente antimicrobiano, não existe tempo suficiente para que a membrana se reorganize para acomodar esta nova mudança na sua organização. É este o mecanismo que tem servido de base para o desenho racional de fármacos com uma toxicidade seletiva para certos organismos. (43) Na questão da produção de novos agentes antimicrobianos, o conceito de complexos metálicos das FQs tem ganho importância, já que estes têm-se revelado potenciais substitutos desta classe de antibióticos. Estes novos derivados das FQs exibem um efeito antimicrobiano comparável ou superior ao respetivo antibiótico na forma livre mas a elevada interação com os lípidos pode favorecer uma via de influxo alternativa, que pode superar o mecanismo de resistência resultante da mutação de porinas. (1,4-8)

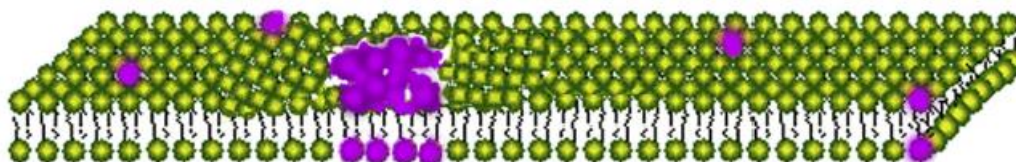


Figura 8. Desenho ilustrativo do tipo de rearranjo dos lípidos que pode ocorrer devido à ligação de certos agentes antimicrobianos catiónicos. O aglomerado de lípidos aniônicos (grupos de cabeça roxa) num domínio separado ocorre como consequência da ligação do agente antimicrobiano. Isto provoca um rearranjo dos lípidos à volta do domínio, deixando defeitos na membrana e no recrutamento de lípidos aniônicos de outros locais da membrana onde podem ser necessários para a sua função. (43)

3. Complexos Metálicos das Fluoroquinolonas

Os fármacos são tipicamente compostos polifuncionais, desenhados para interagir com recetores ou órgãos específicos. O *design* de complexos fármaco-metal são de particular interesse na investigação farmacológica. As combinações de metais com agentes antibacterianos são conhecidas por melhorar a atividade dos fármacos, diminuir a sua toxicidade e atuar como regulador da expressão genética, sendo uma ótima ferramenta em biologia molecular. (67)

Na tentativa de contornar a resistência bacteriana às FQs, têm sido desenvolvidos complexos das mesmas com catiões de metais de transição, genericamente denominados metaloantibióticos. (1,4-8,11,37) As FQs são agentes quelantes para uma variedade de catiões metálicos e são vários os estudos que têm sido relatados e revistos na literatura sobre esta interação. (11,20,68-84) As atividades biológicas destes complexos metálicos têm sido racionalizadas e verifica-se que geralmente dependem da natureza dos iões metálicos, do seu estado de oxidação, natureza e tipo de ligandos coordenados e isómeros. (85) A síntese, propriedades físico-químicas, e características estruturais de vários compostos binários e ternários das FQs, juntamente com a sua atividade biológica foram revistas por Turel. (11)

A grande diversidade de estudos sobre a interação entre as FQs e catiões metálicos realizados demonstra que só os complexos de cobre (II) são suficientemente estáveis em solução sob condições fisiológicas (pH~7,4 e uma gama de concentração na ordem de μM). (4,6,7,16) Evidências recentes mostram ainda que os complexos ternários de cobre-FQ-(1,10)-fenantrolina ($[\text{Cu}(\text{II})/\text{FQ}/\text{phen}]$) são mais estáveis, e conseqüentemente mais ativos, do que os complexos binários do tipo $[\text{Cu}(\text{II})/\text{FQ}]$, sugerindo que esta estabilidade se deve à interação intramolecular dos ligandos. (1,8,16,21,25)

O atual interesse dos complexos de cobre advém da sua potencial utilização como agente antimicrobiano, antiviral, anti-inflamatório ou mesmo agente anti-tumoral, bem como das suas propriedades de intercalação, devido ao seu papel biológico e atividade sinérgica com fármacos. (6,7,37) Além disso, os complexos de cobre comportam-se como nucleases químicas eficientes, quando preparados por combinação de fármacos e ligandos heterocíclicos dadores de azoto. (10) Desde a sua descoberta em 1979, que os iões de cobre foram capazes de clivar DNA quando complexados com 1,10-fenantrolina (*phen*). (4,16) A fenantrolina é amplamente usada em química de coordenação, sendo um ligando bidentado (NN) considerado um bom agente quelante de iões metálicos. (25) Deste modo,

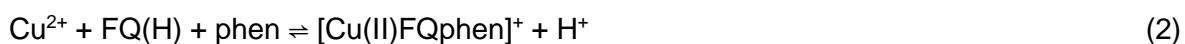
a atividade biológica destes metaloantibióticos parece combinar a atividade antibacteriana das FQs e a atividade de DNAase dos complexos cobre(II)/*phen*, o que os torna ainda mais promissores para tentar contrariar a resistência bacteriana. (5,21)

3.1 Complexos Ternários de Cobre(II)

O cobre é um ião metálico fisiologicamente relevante que tem um papel importante, quer como metal vestigial essencial quer como constituinte de vários compostos administrados exogenamente em seres humanos. (4,7,10) No estado de oxidação 2+, o cobre tem a configuração eletrônica $1s^22s^22p^63s^23p^63d^9$. Os números de coordenação adotados pelo cobre (II) são quatro, cinco e, mais usualmente, seis. Porém, a estrutura de coordenação octaédrica regular é muito rara devido à presença de nove elétrons na orbital 3d, o que causa uma distorção no arranjo octaédrico dos ligandos – efeito de Jahn-Teller. Esta distorção geralmente conduz a um alongamento de duas ligações resultando em duas ligações curtas e duas longas no plano equatorial. O tipo de complexos formados por Cu(II) com ligandos bidentados coordenados através de átomos de azoto, depende da disposição espacial dos dois átomos doadores e dos impedimentos estéreos da molécula de ligando. No caso de complexos de cobre (II) contendo a 1,10-fenantrolina como ligando, uma grande variedade de complexos é conhecida, no qual o cobre se encontra penta-coordenado. (86-88)

A formação do complexo metálico da FQ pode ser atribuída à existência combinada de dois ligandos com anéis de cinco e/ou seis átomos, a interações de empilhamento $\pi-\pi$ entre os anéis aromáticos, e a ligações por retrodoação π , uma interação mediada por cobre(II), resultando numa sinergia que favorece a formação de complexos ternários (21,89-91). Na literatura está demonstrado que a contribuição mais importante deriva das ligações por retrodoação π metal-ligando das bases-N heteroaromáticas presentes (i.e. elétrons d do metal são atraídos para as orbitais π^* dos grupos fenilo da fenantrolina), para além das ligações δ metal-ligando. Devido a este efeito, $\text{Cu}(\text{phen})^{2+}$ é eletrofílicamente semelhante ao Cu^{2+} (aq). Deste modo, a formação de complexos ternários é favorecida, fenómeno que no caso particular dos complexos de Cu^{2+} , deve prevalecer sobre os

restantes fatores de estabilização dado que este íon metálico é um melhor dador π relativamente a outros metais como Co^{2+} e Zn^{2+} (4). Os estudos de especiação em função do pH para a estabilidade dos sistemas ternários Cu(II):FQ:phen (1:1:1) em solução assumem o seguinte modelo:



Onde FQ(H) corresponde à fluoroquinolona na forma de íão-dipolar e FQ à forma desprotonada. Estes equilíbrios têm em conta a constante de acidez dos ligandos (FQ e phen) e a protólise dos catiões metálicos divalentes. As constantes de estabilidade encontradas na literatura para os complexos metálicos das FQs, numa gama de concentração na ordem dos μM , mostram que nestas condições, os complexos binários $[\text{Cu(II)/FQ}]$ são totalmente dissociados, enquanto que o complexo ternário é estável e há a predominância das espécies $[\text{Cu(II)FQ(H)phen}]^{2+}$ e $[\text{Cu(II)FQphen}]^+$, a pH fisiológico. (4,7,8,21) Na Tabela 2 encontram-se sumariadas as constantes de estabilidade para o Cu^{2+} na formação dos complexos ternários da Ciprofloxacina, Levofloxacina e Moxifloxacina, os antibióticos usados neste estudo. (4) Devido à estabilidade destas espécies de complexo a pH fisiológico e à sua natureza catiónica, as interações eletrostáticas com os grupos carregados negativamente das cabeças dos fosfolípidos são promovidas, aumentando consideravelmente a sua interação com a membrana. (5,21)

Tabela 2. Constantes de estabilidade dos complexos de Cu(II) determinados a 25°C e $I = 0,1 \text{ M}$ (NaCl). (4)

	Cpx	Lvx	Mxfx
log CuHFQPhen	$17,96 \pm 0,05$	$16,53 \pm 0,04$	$15,95 \pm 0,04$
log CuFQPhen	$8,42 \pm 0,04$	$9,30 \pm 0,09$	$7,84 \pm 0,09$

3.1.1 Descrição da Estrutura Cristalina

Os dados cristalográficos da literatura confirmam inequivocamente a formação de complexos ternários de cobre(II) catiónicos com *phen* e diversas FQs, nomeadamente FQs de segunda geração, como $[\text{Cu}(\text{nfx})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3) \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, podendo haver algumas diferenças na hidratação de moléculas de água de acordo com diferentes estudos (4,92), $[\text{Cu}(\text{cpx})(\text{phen})](\text{NO}_3) \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (93), $[\text{Cu}(\text{erx})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (94), $[\text{Cu}(\text{ofx})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (4) e $[\text{Cu}(\text{lmx})(\text{phen})(\text{NO}_3)] \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (4). A estrutura de vários complexos de cobre(II) das FQs por cristalografia revela que estes complexos exibem centros metálicos pentacoordenados com uma geometria piramidal quadrangular ligeiramente distorcida. No plano equatorial, as FQs atuam como ligandos bidentados que coordenam ao catião metálico através dos átomos de oxigénio dos grupo carbonilo e carboxilato adjacentes, e a 1,10-fenantrolina coordena por dois átomos de azoto. A posição axial é geralmente ocupada por uma molécula de água ou a partir de um ião nitrato, no caso da *lmx* (Figura 9). (4,7,8)

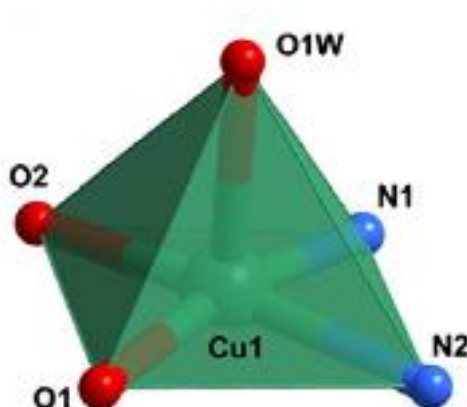


Figura 9. Representação esquemática da geometria piramidal quadrangular ligeiramente distorcida do centro $\{\text{CuN}_2\text{O}_3\}$. (4)

As estruturas moleculares dos cinco complexos catiónicos de cobre(II) mencionados acima estão representadas na Figura 10 e apresentam esferas de coordenação semelhantes. (4)

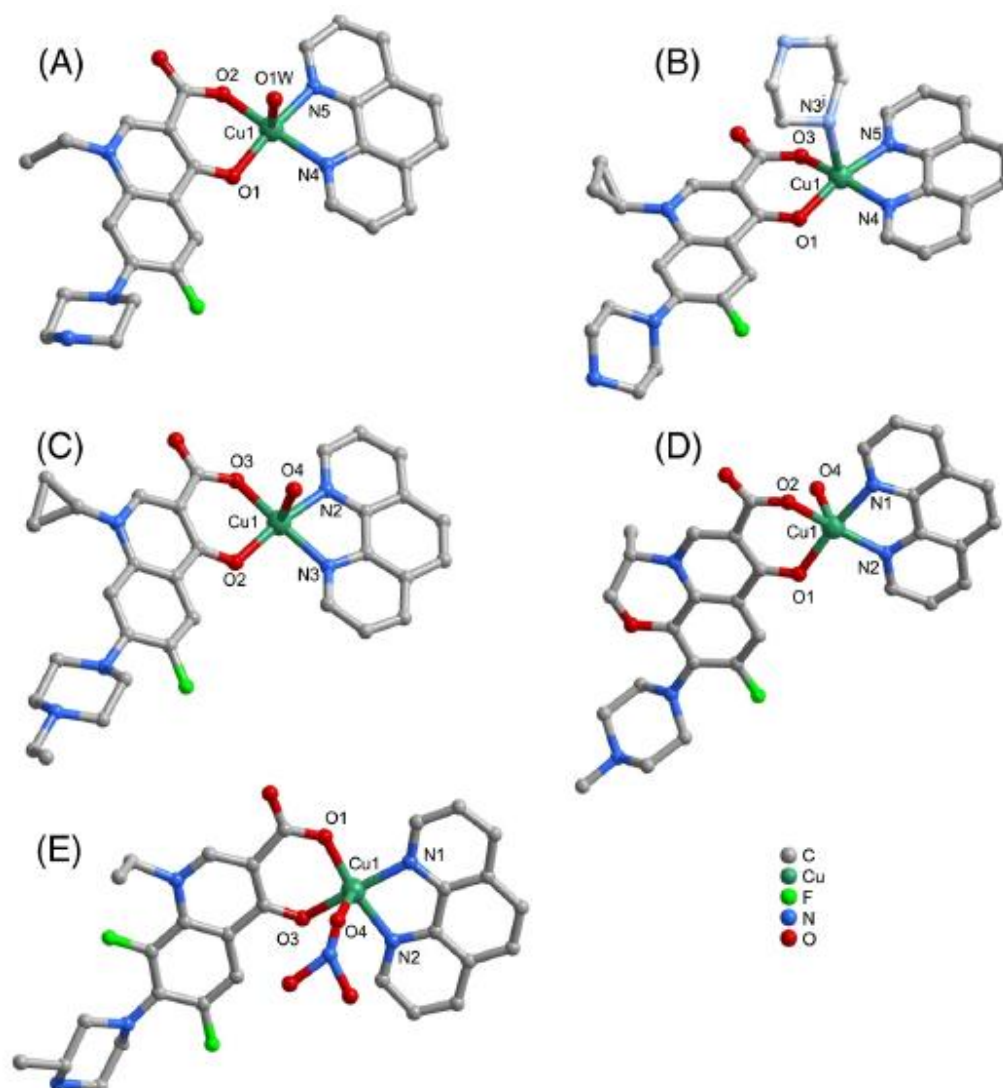


Figura 10. Representação esquemática das estruturas cristalinas dos complexos ternários de FQs de segunda geração: (A) $[\text{Cu}(\text{nfx})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3) \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, (B) $[\text{Cu}(\text{cpx})(\text{phen})](\text{NO}_3) \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, (C) $[\text{Cu}(\text{erx})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, (D) $[\text{Cu}(\text{ofx})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e (E) $[\text{Cu}(\text{lmx})(\text{phen})(\text{NO}_3)] \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Os átomos de Hidrogénio estão omitidos por simplificação. (4)

Como é típico em complexos estruturalmente análogos, as distâncias Cu-O e Cu-N no plano equatorial estão entre 1.8-2.0 Å, enquanto a ligação Cu-O (H₂O) é consideravelmente maior (entre 2.2 e 2.3 Å). Além disso, para os ângulos *cis* e *trans* N/O–Cu–O/N, foram determinados os intervalos 80-105° e 165-170°, respetivamente. (4,8)

No complexo Cu(II)/cpx/phen, a molécula cpx (2^a geração) comporta-se como um ligando tridentado em ponte desprotonado, coordenado ao centro de Cu(II) através do oxigénio do grupo carbonilo e um oxigénio carboxilato, e a um centro de Cu(II) vizinho através de um azoto do anel do grupo piperazina terminal. A esfera de coordenação é completada por dois átomos de azoto de *phen* originando uma esfera de coordenação {CuN₃O₂} (Figura 10(B) e Figura 11). (4) O centro independente Cu(II) em cristalografia é igualmente penta-

coordenado, revelando uma geometria piramidal quadrangular ligeiramente distorcida, com dois oxigénios do ligando *cpx* e dois átomos de azoto do ligando *phen* em posições equatoriais, e o átomo de azoto do anel de piperazina de um equivalente cristalográfico da molécula *cpx* na posição axial. Este padrão de coordenação leva à formação de um polímero catiónico em cadeia de coordenação unidimensional (Figura 11), $[\text{Cu(II)/cpx/phen}]^+$. Estas cadeias catiónicas são mediadas por um número considerável de ligações de hidrogénio fracas $\text{C-H}\cdots\text{O}$ e $\text{C-H}\cdots\text{F}$ e interações de empilhamento $\pi\cdots\pi$ que envolvem os anéis de *phen* dos complexos vizinhos. Estas disposições estruturais originam espaços que podem acomodar contra iões NO_3^- e a cristalização de moléculas de água. Adicionalmente, esses iões nitrato e moléculas de água são cruciais para a estabilização das estruturas cristalinas estendidas, visto que estão envolvidas num grande número de ligações de hidrogénio ($\text{O-H}\cdots\text{O}$ e $\text{O-H}\cdots\text{N}$) com as moléculas de água coordenadas, os átomos de oxigénio das piridonas e grupos carboxilato, e os átomos de azoto dos ligandos FQs. (4)

Cadeia de coordenação 1D



Figura 11. Representação esquemática do polímero de coordenação (cadeia) 1D de $[\text{Cu(cpx)(phen)}]^+$, formado na estrutura cristalina de Cu-cpx-phen. Omissão dos átomos de Hidrogénio por simplificação. (4)

A estrutura cristalina do complexo Cu-lvx-phen (3^a geração) recentemente estudada (4,7) confirma a formação do complexo ternário $\text{Cu(lvx)(phen)(H}_2\text{O)}][\text{NO}_3]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Figura 12). Os principais fatores estruturais deste complexo, em particular, as características geométricas do centro de coordenação Cu(II), incluindo distâncias e ângulos de ligação e o arranjo cristalino, são comparáveis aos complexos ternários de Cu(II) com FQs de gerações anteriores (Cu-nfx-phen, Cu-cpx-phen, Cu-erx-phen e Cu-ofx-phen). (4,7) Para os complexos Cu-spx-phen e Cu-mxfx-phen (4^a geração) esta estrutura ainda não foi confirmada devido ao facto de ainda não se ter obtido cristais isolados adequados destes complexos. (4)

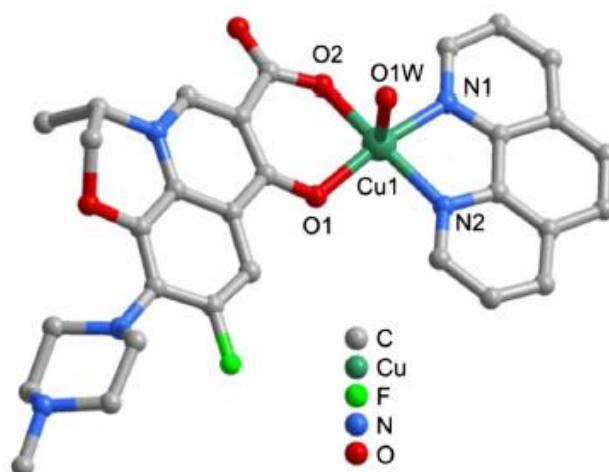


Figura 12. Representação esquemática da estrutura cristalina do complexo catiónico $[\text{Cu}(\text{lvx})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Cu-lvx-phen). (4)

3.2 Atividade Antibacteriana dos Complexos Metálicos das FQs

Dada a enorme estabilidade dos complexos ternários das FQs, estudos prévios já testaram a eficácia das FQs na forma livre e do seu respetivo complexo ternário de cobre contra diversas estirpes de bactérias Gram-negativas. (1,4-8,21,22) Os valores da concentração mínima inibitória (MIC) obtidos não demonstraram nenhuma diferença significativa na eficácia entre a FQ e o respetivo metaloantibiótico. Estes resultados sugerem que, nem as alterações das propriedades químicas do antibiótico que resultam da coordenação com o catião metálico, nem o aumento considerável do complexo metálico comparado com o antibiótico livre, travam a eficácia da FQ como agente antimicrobiano. Contudo, uma maior diferença nestes valores de MIC é observada em ensaios realizados em mutantes laboratoriais de *E. coli* K12, deficientes em determinadas porinas (mais concretamente em OmpF). Este valor aumenta consideravelmente para as FQs na forma livre, confirmando a entrada destes antibióticos dependentes da via porina. No caso dos metaloantibióticos, o aumento de MIC não é tão pronunciado, sugerindo que o complexo pode penetrar a membrana externa das bactérias Gram-negativas por uma via adicional independente de porinas. (4,7,8,21)

Aliada a uma via de translocação diferente, os metaloantibióticos têm adquirido cada vez mais interesse devido ao facto destes complexos ternários exibirem uma elevada afinidade de ligação ao DNA e atuarem como nucleases em DNA de plasmídeos, genómico e internucleosomal. (25,77,92,93,95-98) A degradação de DNA ocorre sob condições redutoras, por um mecanismo que envolve radicais hidroxilo. Na presença de H_2O_2 ou ascorbato, os metaloantibióticos são capazes de produzir radicais hidroxilo e superóxido a partir de uma reacção tipo-Fenton ou Haber-Weiss, com a consequente redução do Cu(II) a Cu(I). Por sua vez, os radicais formados, espécies altamente reativas em oxigénio clivam eficientemente o DNA. A natureza catiónica do complexo promove interações eletrostáticas entre este e os grupos fosfato do esqueleto do DNA. Assim, a clivagem do DNA é possível graças à proximidade entre estas espécies. (99,100)

Deste modo, os complexos [Cu(II)/(FQ)/phen] parecem ser candidatos adequados para mais ensaios laboratoriais. Dada as diferentes características hidro/lipofílicas destes complexos, o ataque direto das membranas bacterianas aparenta ser o foco central da sua captura, podendo contornar a resistência bacteriana a FQs. Esta probabilidade aumenta tendo ainda em conta a possível atividade de DNAase dos complexos ternários. (1,4,6,7,21,22,37)

O presente estudo, focou-se na análise da interação e localização de metaloantibióticos com a membrana externa de bactérias Gram-negativas. Os complexos ternários utilizados centraram-se em FQs de 2^a, 3^a e 4^a geração, mais concretamente, da Ciprofloxacina, Levofloxacina e Moxifloxacina.

4. Técnicas Utilizadas

Neste capítulo apresentam-se alguns aspectos relevantes sobre as várias técnicas utilizadas neste estudo. É feita uma abordagem sobre a preparação de lipossomas como modelo mimético da membrana externa de bactérias Gram-negativas, bem como das suas características físico-químicas. A espectroscopia de fluorescência foi a ferramenta base usada nos estudos biofísicos, apresentando-se por isso uma contextualização específica e descrição dos modelos matemáticos utilizados. Este capítulo contém ainda uma abordagem teórica sobre os equipamentos e procedimentos experimentais executados.

4.1 Lipossomas como Modelo de Membranas Biológicas

O transporte de fármacos através da membrana celular é um processo biológico complexo, muitas vezes difícil de compreender devido à natureza dinâmica desta estrutura. (101) Desta forma, o desenvolvimento de sistemas modelo membranares lipídicos têm-se demonstrado muito úteis para ajudar os investigadores a compreender o papel dos lípidos nas interações celulares. A organização lipídica destes sistemas imita o arranjo dos lípidos nas membranas celulares naturais e podem apresentar-se em diversas formas como bicamadas, monocamadas e lipossomas. (41,101)

A interação entre vesículas lipossômicas e quinolonas tem vindo a ser mencionada como referência na compreensão da difusão destes antibióticos através de bicamadas lipídicas. (102) Têm ainda a vantagem de permitir o uso de várias técnicas espectroscópicas, como a fluorescência, para estudos biofísicos. (101) Desta forma, utilizaram-se lipossomas como modelo para mimetizar a membrana externa de bactérias Gram-negativas.

4.1.1 Classificação e Propriedades Físico-químicas

Os lipossomas são pequenas vesículas esféricas com uma ou mais bicamadas lipídicas, envolvidas por uma fase aquosa. São compostas essencialmente por fosfolípidos, organizados com a sua cabeça polar orientada para o meio aquoso, localizado tanto no exterior como no interior da bicamada. (103,104) O diâmetro dos lipossomas varia entre 0,02 a 10 μm e podem ser classificados com base no seu tamanho e número de bicamadas: vesículas multilamelares (MLVs) compostas por várias bicamadas lipídicas e vesículas unilamelares compostas apenas por uma bicamada. Estas últimas podem ainda ser divididas em vesículas unilamelares grandes (LUVs) e vesículas unilamelares pequenas (SUVs) (Figura 13). (103)

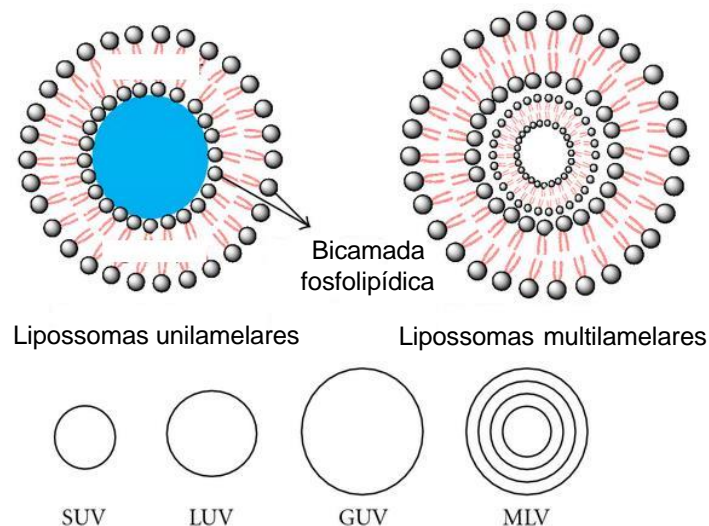


Figura 13. Classificação de lipossomas de acordo com o seu número de bicamadas e respetivo tamanho.

As propriedades físico-químicas dos lipossomas (fluidez e carga) dependem do tipo de lípidos bem como da sua proporção, tamanho das cadeias hidrocarbonadas, carga à superfície, sensibilidade ao pH e respetiva temperatura de transição de fase (T_m). (103,104) Devido à heterogeneidade dos fosfolípidos e à sua organização lateral em diferentes escalas de tempo e comprimento, as transições de fase são uma das propriedades mais importantes a ter em conta no desenvolvimento de um sistema modelo biomembranar. (41) A temperatura de transição de fase é caracterizada pela transição de um estado de grande ordenação e rigidez das cadeias hidrofóbicas para um estado mais desordenado e fluido destas caudas. Deste modo, os lípidos podem apresentar-se fundamentalmente em duas

fases termodinâmicas, fase gel e fase fluída, respetivamente (Figura 14). A temperatura de transição de fase difere entre os fosfolípidos visto que depende da composição das cadeias hidrocarbonadas que cada um possui. Por norma, lípidos com cadeias de ácidos gordos curtas e insaturadas atingem a transição de fase a uma temperatura inferior à dos compostos por cadeias longas e saturadas. A fase de gel, correspondente à mais ordenada, é estabilizada por interações de *van der Waals*, o que explica que lípidos com cadeias mais curtas tenham uma T_m inferior, uma vez que a sua superfície de contacto disponível para interações é menor. (105)

No meio biológico, o comportamento termotrópico dos lípidos influencia a estabilidade e permeabilidade das membranas, o que está intimamente relacionado com as respetivas temperaturas de transição de fase. Desta forma, o desenho racional de modelos lipossómicos requer um conhecimento do seu comportamento quando são submetidos a variações de temperatura. (41)

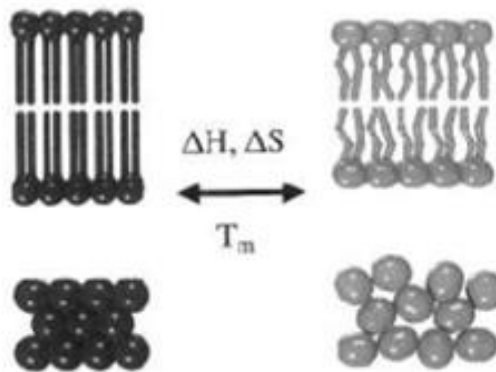


Figura 14. Esquema das fases termodinâmicas das bicamadas lipídicas, fase gel e fase fluída, respetivamente.

4.1.2 Preparação de Lipossomas

As vesículas lipossómicas são sintetizadas em laboratório a partir de lípidos naturais e/ou de origem sintética. (103) O tamanho e o número de bicamadas são propriedades importantes a ter em conta na escolha do modelo mimético membranar. As vesículas unilamelares são melhores sistemas que as MLVs, uma vez que são formadas por uma única bicamada tal como as biomembranas. Devido à sua elevada curvatura, as SUVs

apresentam algumas anomalias no empacotamento dos lípidos, o que faz com que sejam muito sensíveis à degradação pelas biomoléculas. Deste modo, os LUVs têm sido considerados os melhores sistemas a ser usados como modelos membranares, (106) pelo que neste trabalho se procedeu à preparação de LUVs.

A formação espontânea de estruturas membranares foi primeiramente descrita pelo investigador Bangham (107), após a dispersão de fosfolípidos num meio aquoso. Esta dispersão dá origem à formação de MLVs, onde a principal ocorrência de agregação se deve à proteção das cadeias de ácidos gordos das moléculas de água, principalmente por efeitos hidrofóbicos. (107) Este é o processo de preparação mais usual para a obtenção imediata de MLVs. A partir destas vesículas multilamelares podem ser obtidas as restantes espécies. (103)

Neste trabalho, para a preparação de lipossomas optou-se pelo método de hidratação do filme lipídico, que tem por base os princípios descritos por Bangham. A suspensão de MLVs advém da hidratação do filme lipídico originado pela evaporação da solução de lípidos num determinado solvente orgânico, geralmente efetuada num balão de fundo redondo. (108) A formação de LUVs é realizada através do método de extrusão de MLVs com filtros específicos, cujo diâmetro dos poros é bem definido. A extrusão deve ser realizada acima da temperatura de transição dos lípidos intervenientes e devem ser executadas diversas passagens da suspensão lipossómica através do filtro, para garantir um sistema homogéneo com um tamanho bem definido (Figura 15). (4,5,7,10)

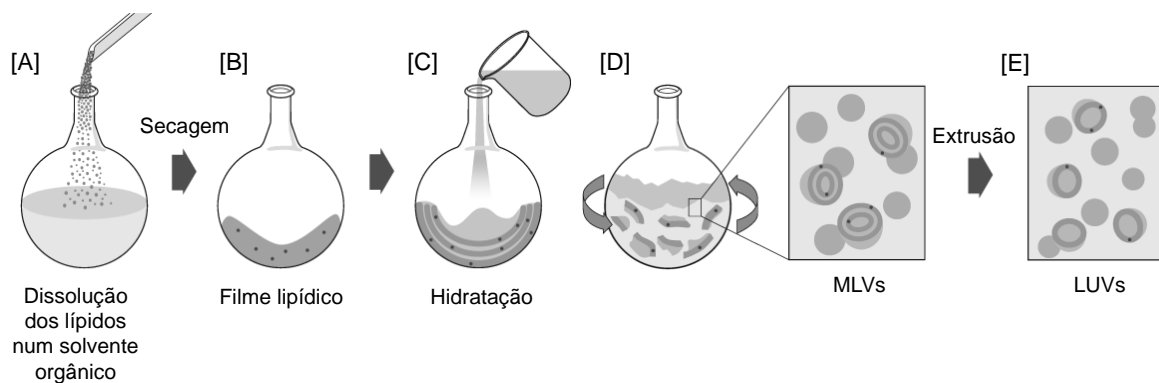


Figura 15. Representação esquemática da preparação de MLV's pelo método de hidratação do filme lipídico. [A] – Dissolução dos lípidos num solvente orgânico adequado; [B] – Formação do filme lipídico nas paredes do balão, por evaporação do solvente orgânico; [C] – Hidratação do filme lipídico por adição de solução aquosa; [D] – Agitação e obtenção de MLV's; [E] – LUV's obtidas por extrusão. (Adaptada de www.avantilipids.com/)

4.1.3 Sistemas Lipossômicos

Para além de mimetizarem corretamente biomembranas, o uso de sistemas lipossômicos como vetor de entrega de fármacos tem inúmeras aplicações nas indústrias de cosmética e farmacêutica. Uma vez que estas vesículas lipossômicas podem ter uma ou mais bicamadas fosfolipídicas, é possível transportar fármacos no meio aquoso ou lipídico, de acordo com a natureza desses fármacos. (102-104)

Devido à flexibilidade estrutural dos lipossomas, é possível formar estruturas com uma composição lipídica idêntica à membrana que se pretende estudar. (33) Como anteriormente referido, os fosfolípidos que formam a membrana externa de bactérias Gram-negativas são essencialmente PE, PG e CL. Neste trabalho, utilizou-se especificamente a composição da membrana externa de *E. coli*, uma bactéria Gram-negativa que se sabe que possui resistência bacteriana às FQs. (6,33) Esta membrana é composta por 57% de lípidos de PE, 15% de lípidos de PG e 10% de lípidos de CL (Figura 16), onde os lípidos PE se encontram na forma de ião-dipolar e os lípidos PG e CL na forma aniônica. A CL é um tipo de lípido com uma estrutura particular. É um fosfolípido com quatro cadeias hidrocarbonadas ligadas a uma cabeça polar com uma carga negativa dupla. Esta cabeça é uma entidade com mobilidade reduzida e possui uma pequena área transversal por lípido. Estas características conferem-lhe rigidez que tem impacto nas propriedades termotrópicas da membrana onde está incorporada. Além destes três tipos de lípidos, existe ainda uma fração de 18% de lípidos não identificados na membrana externa de *E. coli*. (6,41,57) Desta forma, foram preparados LUVs de extrato total lipídico natural de *E. coli*, de forma a mimetizar corretamente a membrana desta bactéria.

Visto que os lípidos são moléculas anfipáticas, é possível avaliar a localização dos fármacos nos LUVs. Deste modo, o antibiótico pode atuar com as vesículas lipossômicas a três níveis distintos: se o fármaco for hidrossolúvel vai encontrar-se no compartimento aquoso do lipossoma, enquanto se for hidrofóbico, encontrar-se-á na zona apolar da bicamada. Porém, se for anfotérico, o fármaco rearranja-se de modo a colocar a sua parte hidrofílica junto aos grupos polares da membrana e a sua parte hidrofóbica junto às cadeias hidrocarbonadas. (103) Os estudos de interação e localização dos metaloantibióticos com LUVs de extrato total de *E. coli* foram realizados através de técnicas de espectroscopia de fluorescência.

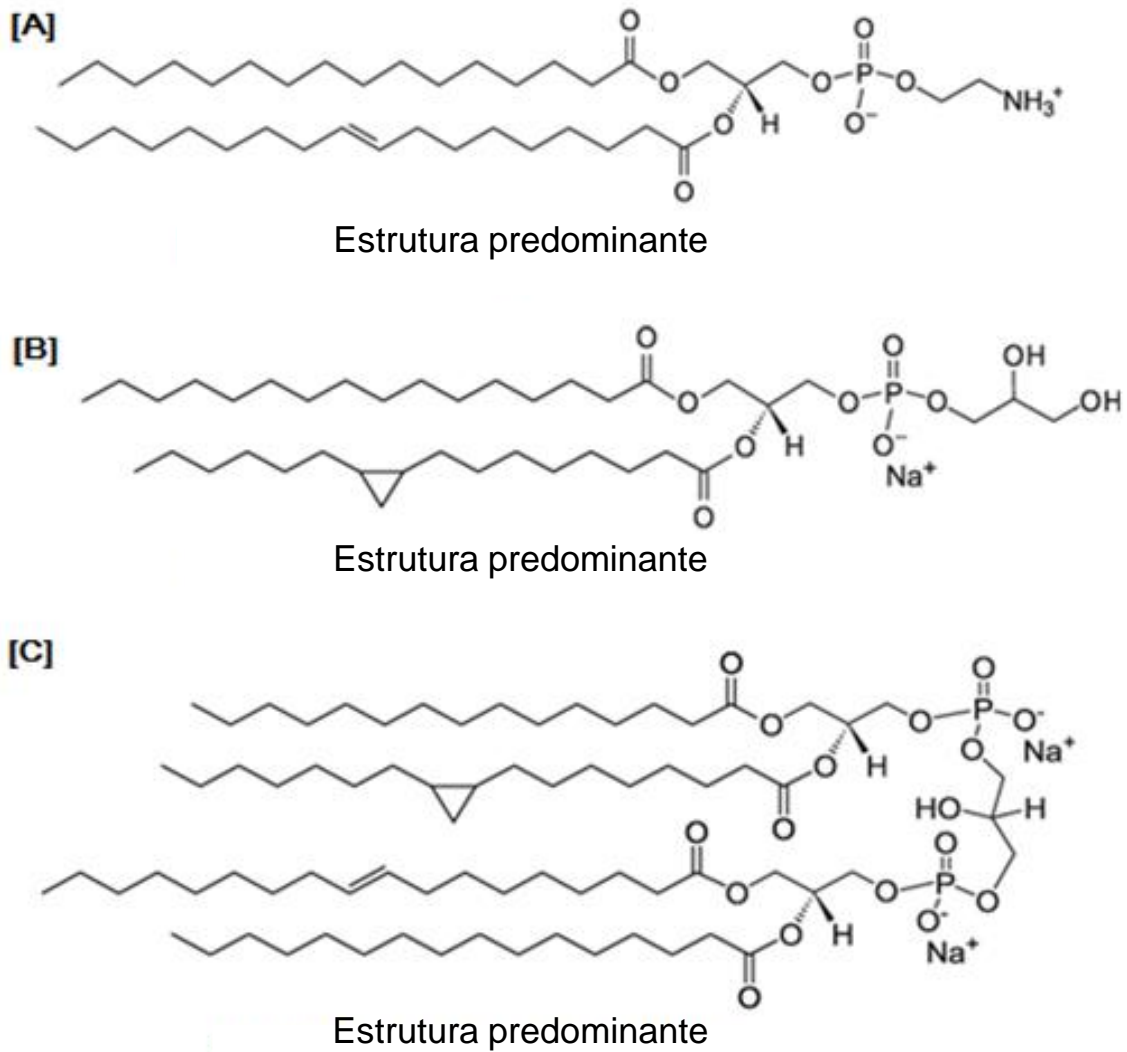


Figura 16. Estrutura molecular predominante dos principais fosfolípidos encontrados para *E. coli*: [A] – PE, [B] – PG e [C] – CL. As estruturas podem variar relativamente ao tamanho e composição das cadeias hidrocarbonadas. (Adaptada de www.avantilipids.com/)

4.2 Espectroscopia de Fluorescência

Durante as últimas décadas deu-se um crescimento notável da utilização da espectroscopia de fluorescência pelos cientistas das mais diversas áreas. Atualmente, a

fluorescência é uma metodologia dominante, altamente sensível e as suas medidas podem fornecer informação de uma vasta gama de processos moleculares. (109)

A espectroscopia consiste no estudo da interação da radiação eletromagnética com a matéria e compreende essencialmente três passos: 1. Irradiação da amostra; 2. Obtenção do espectro ou difractograma; 3. Interpretação dos parâmetros espectrais e recolha de informação. A radiação eletromagnética é descrita como uma oscilação de campos elétricos (E) e magnéticos (B) perpendiculares entre si, onde se deslocam pequenas partículas denominadas fótons. A relação entre o comprimento de onda e a energia destas partículas é descrita pela fórmula de Planck: $E = h\nu$, onde h é a constante de Planck ($6,63 \times 10^{-34}$ J.s) e ν é a frequência que, por sua vez, é inversamente proporcional ao comprimento de onda ($\nu = 1/\lambda$). O espectro eletromagnético engloba radiação com frequências elevadas e, por isso altamente energética como os raios x, até às micro-ondas caracterizadas por possuírem frequências baixas e serem energeticamente mais fracas (Figura 17). (110,111)

Da incidência de radiação eletromagnética numa amostra podem resultar dois processos: dispersão ou absorção. No processo de dispersão vai ocorrer uma modificação da direção de propagação de luz, enquanto na absorção vai haver uma transferência de energia da radiação para a amostra. Para que ocorra o processo de absorção, é necessário fornecer quantidades específicas de energia à amostra, de modo a satisfazer a condição de Bohr: $\Delta E = h\nu$. Os níveis de energia de qualquer átomo ou molécula estão quantizados e, por isso, certas energias são absorvidas e outras não. Cada porção do espectro eletromagnético tem uma quantidade de energia apropriada para a excitação de um determinado processo físico (Figura 17). (110)

O fenómeno de fluorescência é caracterizado pela ocorrência de transições entre estados eletrónicos. A energia que consegue levar à excitação eletrónica abrange a gama do espectro UV-Visível (~190-750 nm), promovendo a passagem dos eletrões de valência para uma orbital mais energética. Posteriormente, os eletrões no estado excitado regressam ao estado fundamental emitindo luz, constituindo o fundamento da espectroscopia de fluorescência. (110,111)

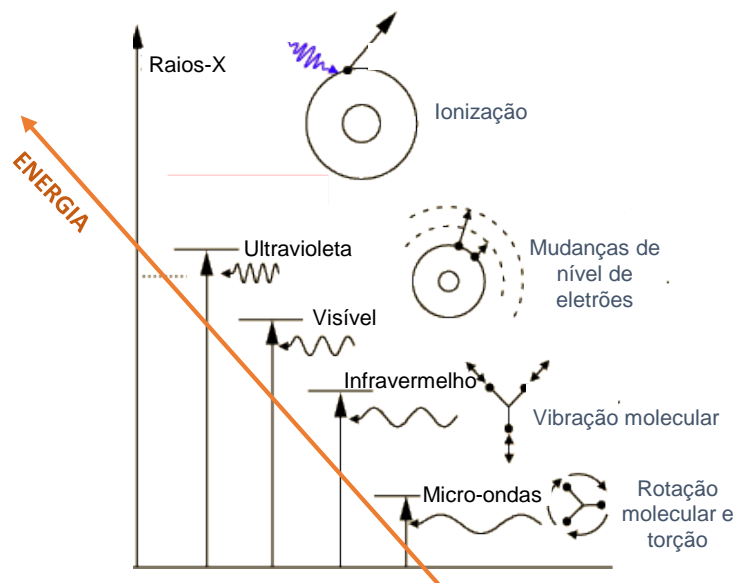


Figura 17. Espectro eletromagnético que se estende desde radiação de baixa frequência (micro-ondas) até radiação com elevadas frequências (Raios-X) e respectivos efeitos resultantes da sua interação com a matéria. (Adaptada de <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/mod3.html>)

4.2.1 Fenômeno de Fluorescência

Uma molécula é excitada pela absorção de um fóton, a qual pode regressar ao estado fundamental com emissão de luz, sendo este um dos efeitos físicos resultantes da interação da luz com a matéria. A emissão de luz a partir de substâncias em estados eletronicamente excitados é denominada luminescência e é convencionalmente dividida em duas categorias – fluorescência e fosforescência – dependendo da natureza do estado excitado. (109)

Em estados singletos excitados, o elétron na orbital excitada está emparelhado (por spin oposto) a um segundo elétron numa orbital no estado fundamental. Consequentemente, o regresso ao estado fundamental é permitido por spin e ocorre rapidamente pela emissão de um fóton. A taxa de emissão de fluorescência é tipicamente 10^8 s^{-1} , de modo que o tempo de vida de fluorescência é perto de 10 ns ($10 \times 10^{-9} \text{ s}$). A fosforescência é a emissão de luz a partir de estados tripleto excitados, no qual o elétron na orbital excitada tem a mesma orientação de spin que o elétron no estado fundamental. Estas transições para o estado fundamental são proibidas e a taxa de emissão é baixa ($10^3 \text{ a } 10^0 \text{ s}^{-1}$), de modo que

os tempos de vida de fosforescência são normalmente na ordem dos milissegundos a segundos. (109)

Os fenómenos de absorção e emissão de luz estão profundamente relacionados e são geralmente ilustrados pelo diagrama de Jablonski (Figura 18). O singleto no estado fundamental e no primeiro e segundo estados eletrónicos estão representados pelas letras S_0 , S_1 e S_2 , respetivamente. Em cada um destes níveis eletrónicos de energia, os fluoróforos podem existir num certo número de níveis de energia vibracional, representados no diagrama por 0, 1, 2. Transições entre os estados eletrónicos são descritas como linhas verticais para ilustrar a natureza instantânea da absorção de luz. Esta descrição assenta no princípio de Franck-Condon, que refere que as transições ocorrem para uma posição fixa do núcleo, em cerca de 10^{-15} s, um tempo muito curto para os arranjos de spin nuclear. (109)

Posteriormente à absorção de luz, outros processos podem ocorrer como a conversão interna (retorno direto ao estado fundamental sem emissão de fluorescência) e cruzamento intersistema (eventualmente seguida por emissão de fosforescência). Porém, estes dois fenómenos com poucas exceções competem com a fluorescência porque ocorrem numa escala de tempo superior ao tempo médio (tempo de vida) durante o qual as moléculas permanecem no estado excitado. (109,112)

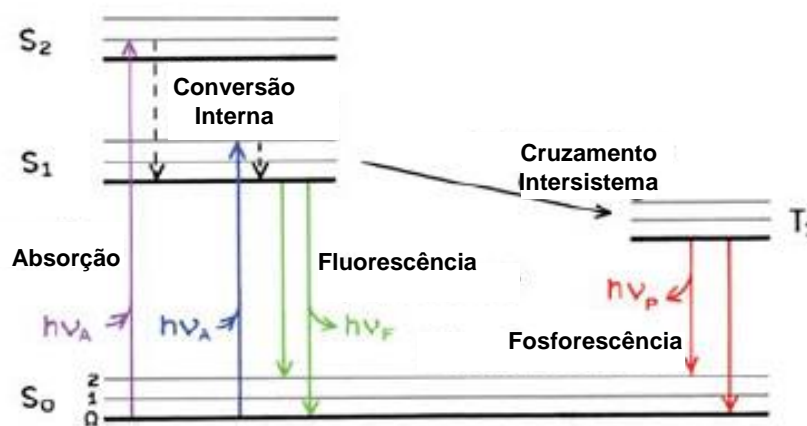


Figura 18. Forma típica do diagrama de Jablonski. A informação detalhada do diagrama encontra-se explicita no texto. (Adaptada de (109))

4.2.2 Medições Espectroscópicas

A emissão de fluorescência advém de parâmetros específicos de cada fluoróforo, sendo as características mais importantes o tempo de vida (τ) e o rendimento quântico (ϕ). O tempo de vida traduz o tempo médio que uma molécula permanece no estado excitado antes de regressar ao estado fundamental, enquanto o seu rendimento quântico representa o número de fótons emitidos relativamente ao número de absorvidos. (109)

As medidas de fluorescência podem ser classificadas em dois tipos: modo estacionário e resolvida no tempo. Enquanto as medidas em modo estacionário são simples, as medidas de fluorescência resolvida no tempo são mais complexas e requerem instrumentação mais cara. Contudo, existem várias vantagens associadas a este segundo tipo de medição, (109) que serão exploradas nos próximos subcapítulos.

O sucesso das medições de fluorescência requer atenção e compreensão da instrumentação. Além disso, existem muitos detalhes experimentais que podem alterar os dados obtidos, (109) apresentando-se uma pequena resenha sobre os equipamentos usados.

4.2.2.1 Fluorescência em Modo Estacionário

As medidas de fluorescência em modo estacionário, ou espectroscopia de fluorescência por excitação contínua, são aquelas que medem a emissão por uma excitação contínua de intensidade de luz. Este tipo de medição, a mais comum, necessita de um espectralfluorímetro cujo diagrama esquemático se encontra representado na Figura 19: este equipamento possui uma lâmpada que funciona como fonte de excitação. Sucintamente, o feixe produzido pela fonte atinge o monocromador de excitação que transmite seletivamente luz com um comprimento de onda específico previamente definido. A luz transmitida passa através de duas fendas ajustáveis, o que diminui a luz difusa (luz com comprimento de onda diferente do selecionado) aumentando, conseqüentemente, a sua resolução. De seguida, esta luz “filtrada” passa pelo centro da amostra, excitando as moléculas que emitem um feixe referente à emissão de fluorescência. Esta segue em direção a um monocromador de emissão, posicionado num ângulo de 90° relativamente ao trajeto da luz de modo a eliminar qualquer luz que não tenha sido absorvida. Neste

monocromador define-se um intervalo de comprimento de onda e a luz emitida atravessa fendas ajustáveis, atingindo o tubo fotomultiplicador (TFM). Neste compartimento a fluorescência detetada é amplificada e quantificada por dispositivos eletrônicos apropriados. O resultado é geralmente apresentado na forma gráfica e armazenado digitalmente. (109)

O equipamento mostrado está ainda equipado com polarizadores que estão presentes tanto no trajeto da luz de excitação como de emissão. Geralmente estes apenas são ativados quando são necessários para determinadas medições, como é o caso da anisotropia de fluorescência. (109)

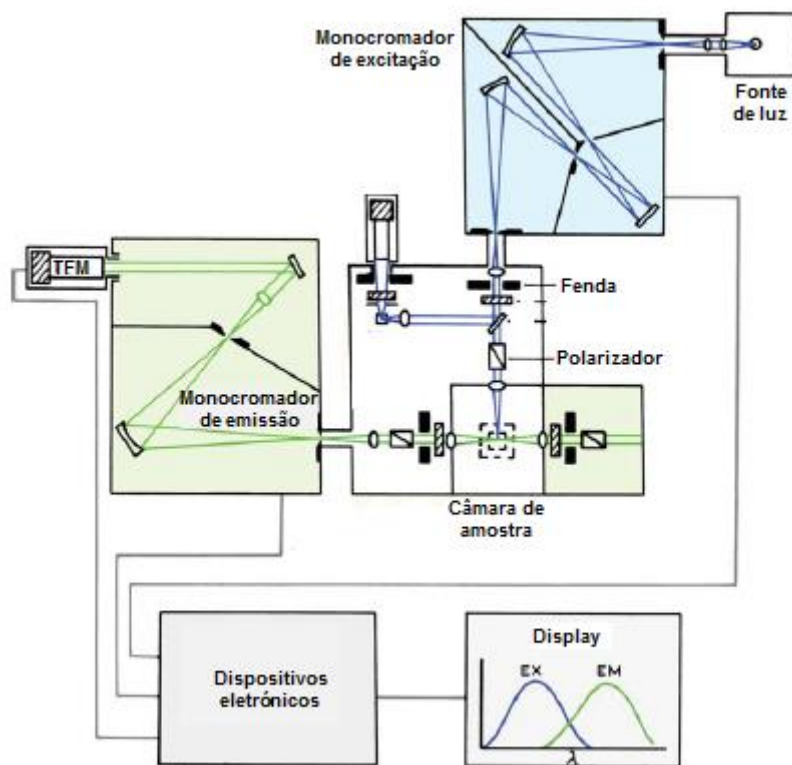


Figura 19. Diagrama esquemático de um espectrofluorímetro. (Adaptada de (109))

4.2.2.2 Fluorescência Resolvida no Tempo

O segundo tipo de medida, resolvida no tempo, é usada para medir decaimentos de intensidade ou decaimentos de anisotropia. O decaimento de intensidade é gravado com

um sistema de detecção de alta velocidade que permite que a intensidade ou anisotropia seja medida numa escala de ns. (109)

A medição de fluorescência resolvida no tempo pode ser realizada através de dois métodos: método de domínio de tempo ou método de domínio de frequência, consoante a amostra seja sujeita a uma excitação pulsada ou modulada, respetivamente. (109) No presente estudo foi utilizado o domínio de tempo como método para medir decaimentos de intensidade. Este decaimento diz respeito à distribuição de tempo pelos fótons emitidos. A emissão é um evento aleatório e cada fluoróforo excitado tem a mesma probabilidade de emitir num determinado período de tempo. Para um grande número de fótons, alguns fluoróforos irão emitir mais rapidamente a seguir à excitação enquanto outros irão emitir em tempos maiores que o tempo de vida, resultando num decaimento exponencial da população no estado excitado. (109)

Nas medições de domínio do tempo ou fluorometria pulsada, a amostra é exposta a um pulso de luz muito curto, de preferência mais curto do que o tempo de vida (τ) da amostra. Uma das técnicas utilizadas para a obtenção do decaimento da intensidade de fluorescência baseia-se no método de contagem de fótons únicos correlacionados no tempo (TCSPC). Neste método, a amostra é excitada por um pulso de luz e os fótons de excitação são correlacionados temporalmente com os fótons emitidos pela amostra. A essência deste método é o conversor tempo-amplitude (TAC), como se pode ver esquematizado na Figura 20. (109)

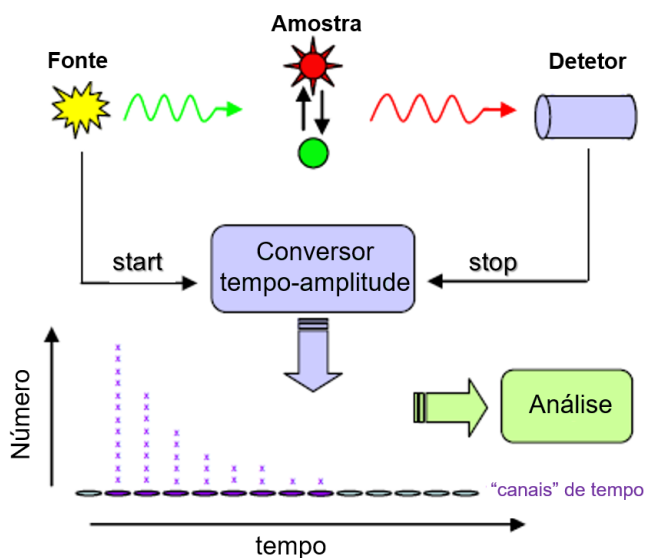


Figura 20. Método TCSPC. Este baseia-se na detecção de tempos de chegada de fótons individuais após a excitação da amostra. A produção de um pulso de luz inicia o sistema eletrónico de contagem (TAC) que é interrompido quando o fóton emitido pela amostra atinge o detetor.

O aparelho eletrônico especializado para medir o tempo de decaimento entre a excitação e a emissão está esquematizado com maior detalhe na Figura 21. A experiência começa com a excitação da amostra (S), usando um pulso de luz de uma fonte de laser ou LED. Cada pulso de excitação é monitorizado através de um discriminador de função constante (CFD), que com precisão mede o tempo de chegada do pulso, e gera uma rampa de voltagem no TAC, que aumenta linearmente numa escala de tempo de ns. Similarmente, o tempo do fóton proveniente da amostra é também detetado em CFD mas interrompe a rampa de voltagem iniciada no TAC. O TAC contém desta forma uma voltagem proporcional ao tempo de decaimento (Δt) entre os sinais de excitação e emissão. Esta voltagem é amplificada (PGA) e convertida num valor numérico por um conversor analógico (ADC) sendo posteriormente armazenada como um evento singular. Uma vez que a taxa de deteção é tipicamente 1 fóton por 100 pulsos de excitação, este processo é repetido até atingir um pico de 10 000 contagens. Os resultados são armazenados na forma de histograma com as contagens de fótons em função do tempo. Cada contagem é associada a um canal com um intervalo de tempo fixo (Δt). Assim, sinais com um tempo $t+\Delta t$ irão ficar registados num canal específico (Figura 20). A largura dos canais também irá influenciar a resolução de tempo do sistema. (109)

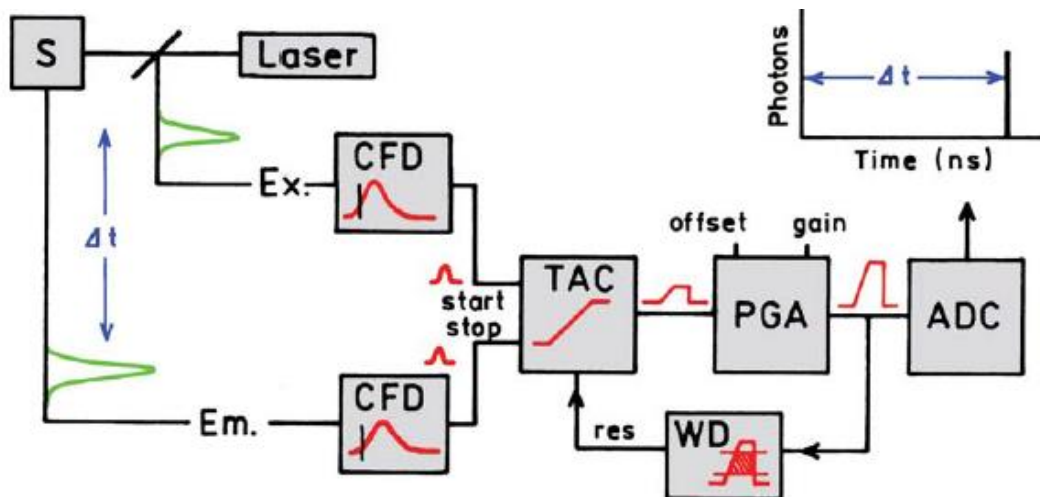


Figura 21. Esquema eletrônico para o método TCSPC. (Adaptada de (109))

4.2.2.3 Dados de Fluorescência Resolvida no Tempo

A interpretação dos dados obtidos por TCSPC é muito mais complexa que os obtidos por fluorescência em modo estacionário e, em geral, não pode ser realizada usando métodos gráficos. Vários métodos podem ser utilizados sendo o mais frequente o uso de um *software* que se baseia no método dos mínimos quadrados. Com o uso do *software* surgem três curvas associadas ao decaimento de intensidade. Essas correspondem aos dados medidos $N(t)_k$, à função de resposta do instrumento $L(t)_k$ e ao decaimento calculado $N_c(t)_k$. Uma vez que os fótons contados são recolhidos em canais específicos, estas funções são descritas em termos de tempos discretos. Os dados obtidos são apresentados como o logaritmo das contagens de fótons ($\log I$) versus tempo (t). (109)

A função de resposta do instrumento ($L(t)_k$) provém do facto do decaimento de intensidade de fluorescência obtido por TCSPC ser afetado pela largura finita do pulso de excitação e pela componente eletrónica de deteção. Esta função, também conhecida como perfil da lâmpada, é usualmente obtida utilizando uma solução diluída de dispersão, tal como sílica coloidal (LUDOX), e sem filtro de emissão. O decaimento obtido é uma convolução do perfil da lâmpada e o decaimento real da fluorescência dos dados medidos ($N(t)_k$) é obtido por um procedimento de desconvolução. (109)

O objetivo do método dos mínimos quadrados é ajustar os dados obtidos com um modelo matemático consistente, de forma a obter parâmetros para o modelo que fornece a melhor correspondência entre os dados medidos e o decaimento calculado. A melhor maneira de determinar uma gama de parâmetros consistentes com os dados é a partir da análise do valor de chi-quadrado (χ_R^2). Este valor χ_R^2 deve ser o mínimo possível, à volta de zero, com um valor significativo próximo da unidade. Se o valor χ_R^2 reduzido for aceitável então os dados são consistentes. No conjunto, se os valores à superfície de χ_R^2 não demonstrarem um mínimo bem definido, então os dados não serão adequados para determinar parâmetros. O tempo de decaimento é calculado a partir do declive do gráfico de $\log I$ versus t obtido. (109)

4.2.2.4 Fluorescência em Modo Estacionário versus Fluorescência Resolvida no Tempo

É importante perceber a relação entre as medidas de fluorescência em modo estacionário e resolvida no tempo. Uma observação estática é simplesmente uma média do fenómeno de fluorescência resolvida no tempo sobre o decaimento da intensidade de uma amostra. A grande vantagem da medição resolvida no tempo assenta no facto de os decaimentos de intensidade conterem informação molecular que é perdida durante o processo de cálculo da média de tempo. (109)

4.2.3 Extinção de Fluorescência

A extinção (“*quenching*”) de fluorescência refere-se a qualquer processo onde há diminuição da intensidade de fluorescência de um fluoróforo na presença de um agente de extinção. Esta técnica implica que haja contacto molecular direto entre ambas as espécies, revelando a acessibilidade dos fluoróforos aos agentes de extinção. Por esta razão, a técnica de extinção de fluorescência resulta em numerosas aplicações bioquímicas. (109) No presente trabalho, os estudos de extinção foram usados para revelar a localização dos metaloantibióticos em lipossomas de extrato total de *E. coli*. Esta aplicação está ilustrada na Figura 22. Como se pode observar, no lado direito da figura, a intensidade de emissão de um fluoróforo localizado à superfície da membrana (F2) vai diminuir na presença de um agente de extinção (E) solúvel em água. Por outro lado, quando um fluoróforo se encontra embebido na membrana (F1) a sua intensidade vai ser menos afetada pelo mesmo agente de extinção (esquerda). (109)

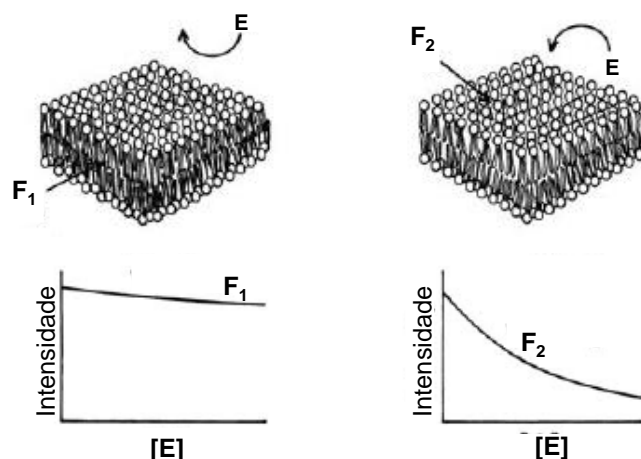


Figura 22. Acessibilidade do fluoróforo (F) ao agente de extinção (E) solúvel em água. (Adaptada de (109))

A extinção de fluorescência pode ocorrer por dois mecanismos diferentes. A extinção estática ocorre quando há formação de um complexo, não fluorescente, entre o agente de extinção e o fluoróforo quando este último se encontra no estado fundamental. A extinção dinâmica ou colisional ocorre quando o agente de extinção colide com o fluoróforo quando este se encontra no estado excitado. Neste mecanismo, o fluoróforo regressa ao estado fundamental sem emissão de fóton e sem qualquer alteração química das moléculas envolvidas após o contacto com o agente de extinção. (109)

4.2.3.1 Agentes de extinção de Fluorescência

Existe uma enorme variedade de pequenas moléculas ou iões que podem atuar como agentes de extinção de fluorescência. O mecanismo de extinção varia com o par fluoróforo-agente de extinção, facto diretamente relacionado com as propriedades químicas destas moléculas. (109)

No presente estudo os agentes de extinção utilizados foram o ião iodeto (I⁻) e a acrilamida. O efeito do ião iodeto faz-se sentir nas propriedades fluorescentes do fármaco quando este se encontra livre em solução, devido à sua incapacidade de acesso a regiões hidrofóbicas. (113) O seu mecanismo de extinção resulta num cruzamento intersistema para um estado excitado tripleto (Figura 18), promovido por um acoplamento spin-orbita entre o halogénio e o fluoróforo excitado no estado singleto. (109) A acrilamida, uma pequena molécula polar,

tem uma eficiência de extinção que é independente da polaridade do microambiente à volta do fluoróforo mas limitada por uma possível blindagem estérea. (36) Sendo um agente de extinção deficiente em eletrões, o seu mecanismo consiste na captura de eletrões a partir de fluoróforos excitados. (109)

Visto que tanto o ião iodeto como a acrilamida atuam em fluoróforos no estado excitado, a medida do tempo de vida fornece um atributo valioso no fenómeno de extinção de fluorescência dinâmica. O tempo de vida é uma das características mais importantes de um fluoróforo, uma vez que determina o tempo disponível para um fluoróforo interagir ou difundir-se no seu ambiente. Consequentemente, esta informação fica disponível a partir da emissão. Sendo que a absorção é um evento instantâneo, menos do que 10^{-15} s, a emissão ocorre durante um período de tempo mais longo. A quantidade de tempo que os metaloantibióticos permanecem no estado excitado fornece uma oportunidade para as interações com o ião iodeto e a acrilamida. (109)

4.2.3.2 Extinção de Fluorescência Dinâmica

Os agentes de extinção utilizados neste trabalho, ião iodeto e acrilamida, originam uma extinção dinâmica. Para os fenómenos de extinção, quer dinâmica quer estática, a diminuição da intensidade de fluorescência é descrita pela equação de Stern-Volmer: (109)

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_{sv}[Q] = 1 + k_q\tau_0[Q] \quad (3)$$

Onde F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença do agente de extinção, respetivamente; k_{sv} é a constante de extinção de Stern-Volmer e $[Q]$ é a concentração do agente de extinção. A constante de Stern-Volmer traduz-se no produto de k_q por τ_0 , onde k_q é a constante biomolecular de velocidade no processo extinção e τ_0 o tempo de vida na ausência do agente de extinção. A representação gráfica de F_0/F versus $[Q]$ origina uma reta de ordenada na origem igual a 1 e declive igual a k_{sv} .

A constante k_{sv} indica a sensibilidade de um fluoróforo ao agente de extinção. Um fluoróforo embebido numa macromolécula é usualmente inacessível a agentes de extinção solúveis em água, como o ião iodeto, sendo nesse caso o valor de k_{sv} baixo. Valores maiores de k_{sv} são encontrados se o fluoróforo estiver livre em solução ou à superfície de uma biomolécula (Figura 22). (109)

Uma característica importante da extinção dinâmica é que além da redução da intensidade de fluorescência emitida, também se observa uma redução do tempo de vida do estado eletronicamente excitado (τ) relativamente ao tempo de vida observado na ausência de agente de extinção (τ_0). Isto significa que a diminuição da intensidade de fluorescência é equivalente à diminuição do tempo de vida do fluoróforo, o que permite escrever:

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\tau_0}{\tau} \quad (4)$$

E, por conseguinte:

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_{sv}[Q] \quad (5)$$

A redução do tempo de vida ocorre porque a extinção de fluorescência é uma razão crescente, à medida que se aumenta a concentração do agente de extinção, despopulando o estado excitado. (109) Apesar da equivalência entre as equações (3) e (5), dada a igualdade da equação (4), a equação (3) apenas é aplicável na análise de dados obtidos por medidas de fluorescência em modo estacionário, enquanto a equação (5) requer instrumentação para obter o registo temporal. Neste trabalho, as medidas de extinção de fluorescência foram realizadas através de fluorescência resolvida no tempo e, por isso, a equação (5) foi a usada no tratamento dos dados.

Uma vantagem importante associada à medida do tempo de vida no fenómeno de extinção de fluorescência é a possibilidade de fazer a distinção entre extinção estática e dinâmica. Na extinção estática não ocorre diminuição do tempo de vida porque só as moléculas

fluorescentes são observadas. Desta forma, os complexos não fluorescentes têm um tempo de vida associado à população não afetada pelo agente de extinção igual ao τ_0 , isto é, $\frac{\tau_0}{\tau} = 1$. (109)

4.2.4 Anisotropia de Fluorescência

A anisotropia de fluorescência é uma técnica invasiva bastante usada para detectar transições de fase em sistemas lipídicos. Tipicamente, as membranas não têm fluorescência intrínseca sendo que é necessário usar sondas fluorescentes que permitam avaliar a fluidez da membrana num intervalo de temperaturas. (41,109)

Neste estudo, foi utilizada a anisotropia de fluorescência em modo estacionário para localizar os metaloantibióticos em LUVs de extrato total de *E. coli*. O objetivo é medir a anisotropia de um fluoróforo na membrana e seguidamente na presença de antibiótico, comparando ambos os perfis. Esta técnica de fluorescência detecta facilmente mudanças no ambiente lipídico das membranas, constituindo assim uma ferramenta poderosa na investigação bioquímica. (41,109)

Em termos físicos, a anisotropia de fluorescência (r) traduz-se no grau de polarização da luz emitida por fluoróforos após serem excitados também por luz polarizada. Esta medida é baseada no princípio da excitação fotoseletiva de fluoróforos. (109)

4.2.4.1 Princípio de Excitação Fotoseletiva de Fluoróforos

O princípio de excitação fotoseletiva de fluoróforos propõe que numa amostra irradiada com luz polarizada, as moléculas cujos momentos de transição estão alinhados paralelamente aos vetores elétricos dos fótons incidentes, terão maior probabilidade de ser excitadas. A origem deste princípio deve-se à existência de momentos de transição para a absorção e emissão posicionados em direções específicas da estrutura do fluoróforo. Numa solução isotrópica, os fluoróforos no estado fundamental estão orientados

aleatoriamente. Após a exposição a uma luz polarizada, há a excitação seletiva de fluoróforos cujos momentos de transição de absorção são paralelos ao vetor elétrico dos fótons incidentes, geralmente orientados ao longo do eixo do z (Figura 23) e cuja emissão de fluorescência é, conseqüentemente, parcialmente polarizada. Este fenômeno é designado de fotoseleção. (109)

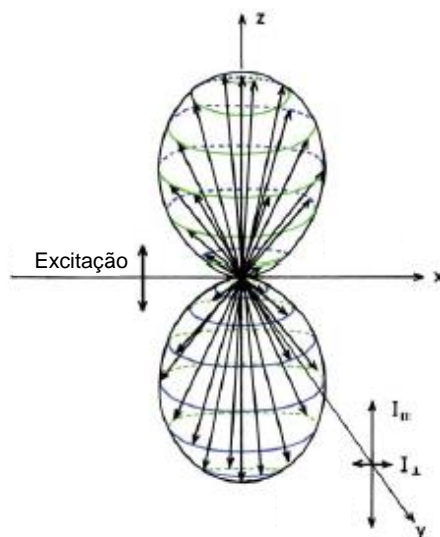


Figura 23. Distribuição de fluoróforos imóveis no estado excitado segundo o eixo do z. (Adaptada de (109))

4.2.4.2 Despolarização da Fluorescência Emitida

A emissão de luz pode tornar-se despolarizada, fenômeno atribuído maioritariamente, à difusão rotacional que altera a direção dos momentos de transição de um fluoróforo. Este deslocamento angular depende da extensão da difusão rotacional durante o tempo de vida no estado excitado. Por sua vez, tais movimentos rotacionais dependem da dimensão da sonda e do sistema onde ela está inserida. As medidas de anisotropia revelam a média do deslocamento angular do fluoróforo que ocorre entre a absorção e subsequente emissão de um fóton. Na prática, o fenômeno de despolarização resulta num decréscimo do valor de anisotropia. (109)

4.2.4.3 Medidas de Anisotropia de Fluorescência

Existem dois métodos utilizados na medição de anisotropia de fluorescência, o método de forma-L e o método de forma-T. No primeiro apenas é usado um canal de emissão, enquanto no segundo são utilizados dois canais. (109) O presente estudo foi realizado pelo método de forma-L. A medida da anisotropia de fluorescência em modo estacionário está representada na Figura 24.

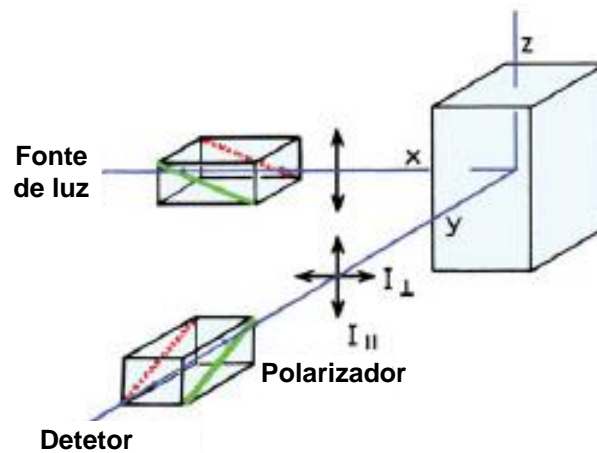


Figura 24. Diagrama esquemático da medida de anisotropia de fluorescência. (Adaptada de (109))

Como é possível observar na figura 24, a amostra é excitada com luz polarizada verticalmente orientada segundo o eixo do z. Assumindo que a intensidade de fluorescência emitida por um fluoróforo é medida na presença de um polarizador, a anisotropia de fluorescência vai ser medida tendo em consideração a orientação do polarizador relativamente ao feixe de excitação. A intensidade de emissão que passa pelo polarizador quando está orientado paralelamente (|| – vertical) é representada por I_{VV} e a que passa pelo polarizador quando está orientado perpendicularmente (\perp – horizontal) é representada por I_{VH} . A anisotropia de fluorescência em modo estacionário é definida pela seguinte equação: (109)

$$r_s = \frac{I_{VV} - I_{VH}G}{I_{VV} + 2I_{VH}G} \quad (6)$$

O fator de correção G traduz a sensibilidade do sistema de detecção de luz, que é dado pelo rácio da intensidade de emissão vertical sobre a horizontal: $G = I_{VH}/I_{HH}$. (109) Este valor é determinado no espectrofluorímetro e deve estar compreendido entre 0 e 1, preferencialmente, o mais próximo possível da unidade.

Nestas medições é necessário proceder à determinação do valor de anisotropia de fluorescência para diferentes temperaturas. Sempre que possível, os valores de anisotropia obtidos neste trabalho foram analisados utilizando a seguinte equação: (41)

$$r_s = r_{s2} + \frac{r_{s1} - r_{s2}}{1 + 10^{B'(\frac{T}{T_m} - 1)}} \quad (7)$$

Onde r_s figura o valor de anisotropia medido; r_{s1} e r_{s2} representam, respetivamente, o valor mais alto e mais baixo de anisotropia obtido experimentalmente; T corresponde à temperatura absoluta e T_m ao ponto médio da temperatura de transição de fase, expressas em graus celsius; B' é um valor associado ao valor que representa a extensão de cooperatividade B . Por sua vez, o valor de cooperatividade pode ser determinado por: $B = [1 - 1/(1 + B')]$, devendo oscilar entre 0 e 1, sendo que mais próximo de 1 é indicativo de uma maior cooperatividade. (41)

4.2.4.4 Sondas de Anisotropia de Fluorescência

Como já referido anteriormente, os lípidos não possuem propriedades fluorescentes. Por esta razão, é necessário usar sondas fluorescentes que particionem preferencialmente na fase lipídica e que possuam fluorescência aprimorada nesta fase, com fluorescência desprezível em água. (41,109)

O TMA-DPH (1-[4-(trimetilamino)fenil]-6-fenil-1,3,5-hexatrieno) e o DPH (1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno) foram as sondas fluorescentes escolhidas neste trabalho, uma vez que as suas características biofísicas são bem conhecidas, sendo extensivamente usadas para detetar transições de fase dos lípidos. Além disso, nem o DPH nem o TMA-DPH mostram qualquer preferência de partição entre a fase gel e fluida dos fosfolípidos e, por isso, é comumente

considerada uma partição igual entre as regiões ordenadas e desordenadas da membrana. (41)

As moléculas de DPH são incorporadas perto do centro da bicamada com uma localização média de ~ 8 Å a partir do centro da bicamada. O TMA-DPH é um derivado do DPH com um grupo catiónico ancorado à posição *para* de um dos anéis fenilo (Figura 25). Devido ao seu grupo catiónico polar, esta sonda anfipática irá estar localizada numa posição pouco profunda, perto da interface água-lípido com a sua fração DPH localizada ~ 11 Å a partir do centro da bicamada. Consequentemente é possível obter informação das regiões a partir do centro ou da interface da bicamada. (41)

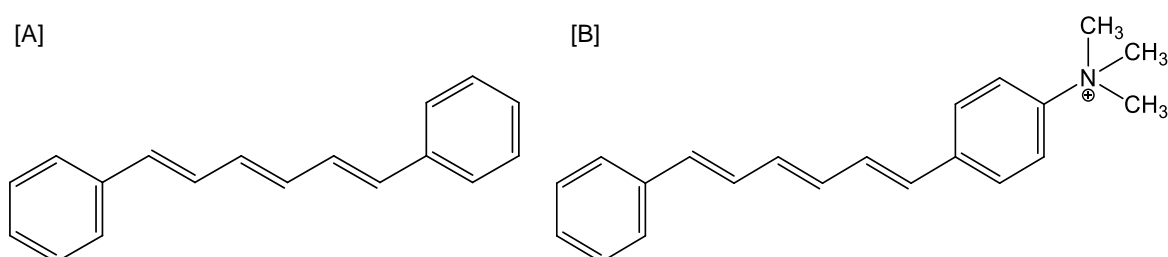


Figura 25. Estrutura química das sondas [A] – DPH e [B] – TMA-DPH.

A utilização das duas sondas fluorescentes na localização dos antibióticos no sistema mimético estudado vai permitir uma abordagem mais profunda, a qual não seria conseguida pela utilização de uma única sonda.

4.2.5 Efeito de Filtro Interno no Espectro de Fluorescência

Quando uma amostra contém espécies que absorvem ao comprimento de onda de excitação ou emissão do fluoróforo, os resultados experimentais são afetados pelo efeito de filtro interno. Este fenómeno consiste numa diminuição da intensidade de fluorescência emitida devido à absorção da radiação de excitação e/ou emitida pelas espécies dissolvidas, incluindo o próprio fluoróforo. (114,115)

Uma vez que ao comprimento de onda de excitação e de emissão correspondente a cada metaloantibiótico nenhuma outra espécie utilizada interfere nas condições experimentais usadas, a intensidade de fluorescência emitida é totalmente da concentração dos

antibióticos. Quando a aplicação fluorescência é em termos qualitativos, este efeito pode ser desprezado desde que os valores de absorvância da amostra sejam mantidos dentro de limites razoáveis, aproximadamente até 0,3 ou menos. Quando a fluorescência é usada para fins quantitativos, como é o caso da determinação do coeficiente de partição, este efeito já requer consideração. (116) A intensidade de fluorescência de um fluoróforo só é proporcional à sua concentração num intervalo limitado de absorvância. (109) Em termos de resultados experimentais este efeito pode ser evitado através da diluição da solução para um valor de absorvância à volta de 0,1. (116)

4.3 Coeficiente de Partição

A interação entre um fármaco e a bicamada lipídica é, provavelmente, o primeiro passo envolvido na sua passagem através da membrana. (5) No estudo da interação de qualquer composto com sistemas modelo membranares, a determinação do coeficiente de partição (K_p) deve ser o primeiro passo. Esta determinação avalia de forma quantitativa a extensão da interação de um soluto com um sistema microheterogéneo. (117) O coeficiente de partição de qualquer composto entre vesículas em suspensão e a solução aquosa é definido como: (1,5,17)

$$K_p = \frac{\left(\frac{C_l}{C_t}\right)/[L]}{\left(\frac{C_w}{C_t}\right)/[W]} \quad (8)$$

Onde C_l e C_w correspondem à concentração molar do fármaco no lípido e no meio aquoso, respetivamente; C_t corresponde à concentração total de fármaco; $[L]$ e $[W]$ representam as concentrações molares de lípido e água ($55,5 \text{ mol.dm}^{-3}$). (5,17) Como se verifica pela definição de coeficiente de partição, a determinação do K_p é dependente apenas da

quantidade de soluto em interação com a membrana (ou em solução aquosa), desde que a quantidade total de soluto seja conhecida. Para esta finalidade dois tipos de metodologias podem ser usadas. Uma requer a separação física das moléculas “ligadas à membrana” e livres em solução e a outra não requer separação de fases. Contudo, a separação física é uma técnica mais trabalhosa e tem como principal desvantagem poder ocorrer uma perturbação do equilíbrio. Por esta razão, neste trabalho utilizou-se o método sem separação física de fases, onde o sistema global de resposta é uma combinação dos sinais das moléculas livres e ligadas. (117)

As principais técnicas usadas para a determinação do coeficiente de partição sem separação de fases são espectroscópicas. (117) Neste trabalho, a determinação do K_p foi realizada através de espectroscopia de fluorescência em modo estacionário. A metodologia mais simples seguida em espectroscopia de fluorescência para determinar o coeficiente de partição de uma molécula entre a fase lipídica e aquosa pode ser realizada em duas abordagens. A primeira consiste em avaliar um parâmetro de fluorescência da molécula particionada quando está em solução aquosa e depois de ser incorporada na membrana. A segunda abordagem consiste na incorporação de uma sonda na membrana, que resulta na mudança de uma propriedade de fluorescência por incorporação de uma molécula. (117) Uma vez que os metaloantibióticos têm propriedades fluorescentes, foi possível determinar diretamente o coeficiente de partição sem ser necessário recorrer à incorporação de sondas. (1,5)

4.3.1 Determinação através de Fluorescência em Modo Estacionário

O coeficiente de partição, entre os metaloantibióticos e os LUVs, de extrato total de *E. coli*, foi determinado por medidas de fluorescência em modo estacionário. Uma vez que a fluorescência dos metaloantibióticos em solução aquosa é alterada pela sua partição na bicamada lipídica, é possível determinar o coeficiente de partição por fluorescência. Desta forma, a equação (8) pode ser reformulada de forma a permitir o cálculo dos coeficientes de partição, utilizando um método não linear através da seguinte equação:

$$\Delta I = \frac{\Delta I_{max} K_p [L]}{[W] + K_p [L]} \quad (9)$$

Onde ΔI é a diferença entre a intensidade de fluorescência do metaloantibiótico medido na presença de vesículas lipídicas (I) e na sua ausência (I_0); $[L]$ representa a concentração molar do lípido; K_p é o coeficiente de partição. $\Delta I_{max} = I_{\infty} - I_0$ é a diferença máxima na intensidade e I_{∞} representa o valor limite de I . (5,17) Esta equação foi utilizada para a análise dos dados obtidos. Os valores de K_p são obtidos por ajuste não linear da equação (9) aos dados experimentais ($\Delta I = f[L]$), para uma concentração total de fármaco, e representam a razão molar de fármaco entre uma componente membranar e uma fase aquosa.

5. Objetivos

Este trabalho teve como principal objetivo estudar a interação e respectiva localização de metaloantibióticos de FQs num sistema modelo da membrana externa de bactérias Gram-negativas, de forma a encontrar novas perspectivas no combate à resistência bacteriana a FQs. Os complexos metálicos utilizados tiveram por base cobre (II), 1,10-fenantrolina e uma FQ de 2ª, 3ª e 4ª geração, mais concretamente, a Ciprofloxacina, Levofloxacina e Moxifloxacina. A interação de cada metaloantibiótico com o sistema mimético da membrana bacteriana foi estudada através da determinação do coeficiente de partição por espectroscopia de fluorescência em modo estacionário. A localização destes antibióticos foi executada por duas técnicas de espectroscopia de fluorescência:

- Extinção de fluorescência por fluorescência resolvida no tempo;
- Anisotropia de fluorescência por fluorescência em modo estacionário.

II. EXECUÇÃO EXPERIMENTAL

Neste capítulo são indicados os reagentes e a instrumentação utilizada durante a execução deste trabalho. São ainda descritas a preparação de soluções bem como as condições experimentais utilizadas na realização dos estudos biofísicos.

1. Reagentes e Soluções

A Levofloxacin e Ciprofloxacin, adquiridas à Fluka, e a Moxifloxacin, oferecida pela Bayer®, foram armazenadas ao abrigo da luz, à temperatura ambiente e usadas sem purificação adicional.

O lípido Extrato total de *E. coli* foi adquirido à Avanti Polar Lipids, armazenado a -18 °C, ao abrigo da luz, e utilizado sem qualquer pré-tratamento.

Os solventes clorofórmio (CHCl_3 , ReagentPlus®, $\geq 99,8\%$) e metanol (CH_4O) foram adquiridos à Sigma e à Fisher Chemical, respetivamente.

As sondas fluorescentes 1,6-fenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) adquirida à Sigma e 1-(4-trimetilaminofenil)-6-fenil-1,3,5-hexatrieno (TMA-DPH) adquirida à Fluka (TLC $\geq 98\%$), foram dissolvidas em clorofórmio e metanol, respetivamente, aquando da sua utilização. Ambas as sondas foram armazenadas a -18 °C protegidas da luz.

A solução tampão HEPES foi preparada a partir da pesagem rigorosa do ácido 4-(2-hidroxi-etil)piperazina-1-etanossulfónico ($\geq 99\%$) e dissolvido em água desionizada, na concentração de 10 mmol dm^{-3} , pH 7,4 e força iónica ajustada a $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ com NaCl, ambos adquiridos à Sigma.

A solução padrão de cobre ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) utilizada na síntese dos metaloantibióticos por mistura de componentes, foi preparada a partir da dissolução do reagente adquirido à Merck em água desionizada, titulada com EDTA e armazenada à temperatura ambiente. A solução de 1,10-fenantrolina (*phen*) foi preparada pela dissolução em HEPES do reagente adquirido à Sigma e armazenada a 4°C ao abrigo da luz.

Os sais $[(\text{CuLevoPhen})(\text{H}_2\text{O})_3(\text{NO}_3)]$, $[(\text{CuCiproPhen})(\text{H}_2\text{O})_5(\text{NO}_3)]$ e $[(\text{CuMoxiPhen})(\text{H}_2\text{O})_5(\text{NO}_3)]$ sintetizados no nosso laboratório (4,7), protegidos da luz e armazenados à temperatura foram utilizados diretamente por dissolução em tampão HEPES.

As soluções de metaloantibióticos utilizadas, obtidas quer por mistura de componentes quer diretamente por dissolução do sal, foram preparadas por diluição em tampão HEPES de soluções mais concentradas, armazenadas a 4°C e ao abrigo da luz.

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

A solução de iodeto de potássio ($\sim 5 \text{ mol dm}^{-3}$) foi preparada no dia da sua utilização a partir da pesagem rigorosa de iodeto de potássio (KI, Pronalab®) e dissolução em tampão HEPES. Adicionou-se à solução tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Merck *pro analysis*,

99,5%), na concentração de $\sim 10 \text{ mmol dm}^{-3}$, para prevenir a formação de I_3^- . A concentração de iodeto (I^-), em cada preparação, foi doseada por titulação utilizando uma solução padrão de iodato de potássio (Merck *pro analysis*) como titulante, em meio HCl concentrado, e tetracloreto de carbono como indicador (CCl_4 , Pronalab®). A solução foi armazenada a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ e protegida da luz.

A solução de acrilamida na concentração de 5 mol dm^{-3} foi preparada pela pesagem rigorosa de acrilamida, com um grau de pureza de 99% adquirida à Sigma, dissolvida em tampão HEPES e armazenada a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ao abrigo da luz.

2. Instrumentação

As pesagens foram efetuadas na balança analítica Mettler AT 201 ($\pm 2 \times 10^{-5} \text{ g}$) e na semi-analítica Mettler AE 160 ($\pm 2 \times 10^{-4} \text{ g}$). Para as medições de pH utilizou-se um decimilivoltmetro da marca Crison, modelo GLP 22⁺ e um elétrodo combinado também da marca Crison.

A suspensão de lipossomas unilamelares (LUVs) foi obtida pela extrusão da suspensão de lipossomas multilamelares (MLVs) num Extrusor Lipex Biomembranes de capacidade 10 mL e com filtros de policarbonato da Whatman. As extrusões foram realizadas acima da temperatura de transição do lípido através de um banho termostaticado da Clifton acoplado ao extrusor.

O tamanho das partículas lipossômicas preparadas foi determinado pela dispersão dinâmica de luz (DLS) usando um equipamento de espectroscopia de correlação fotónica Zeta Sizer Nano Zs da Malvern Instruments.

A homogeneização de todas as soluções utilizadas foi efetuada num ultrassons Bandelin Sonorex Digitec.

As determinações espectroscópicas de UV-Vis foram realizadas num espectrofotómetro Lambda 25 UV/Vis com um controlador de temperatura PTP – A Air Cooled Peltier System, ambos da Perkin Elmer®.

As medições de fluorescência em modo estacionário foram realizadas num espectrofluorímetro Cary Eclipse equipado com um controlador de temperatura “single cell peltier accessory” ambos da Varian.

As medições de fluorescência resolvida no tempo foram efetuadas num fluorímetro Tempo acoplado a um controlador “single photon counting” (FluoroHub), ambos da Horiba Scientific, com controlo de temperatura efetuado com um banho termostático da marca Julabo. A excitação foi realizada com uma fonte Nano LED de 290 nm da Horiba.

3. Preparação de Metaloantibióticos em Solução

As soluções de metaloantibióticos obtidas pela mistura de componentes foram preparadas a partir das soluções padrão de cobre e de *phen* com a respetiva FQ previamente pesada, em proporções estequiométricas (1:1:1) tal como descrito na literatura. (1,4-7,22)

Todas as soluções de metaloantibióticos, incluindo as obtidas diretamente dos sais, foram preparadas por dissolução em tampão HEPES e homogeneizadas durante, pelo menos, 30 minutos no ultrassons. Depois de totalmente dissolvidas, as soluções de metaloantibióticos foram armazenadas a 4 °C protegidas da luz.

Previamente à utilização das soluções preparadas foi verificada a presença de metaloantibiótico através de espectroscopia UV-Vis.

4. Preparação de Lipossomas

Dissolveu-se a quantidade pretendida de lípido (extrato total de *E. coli*) em clorofórmio num balão de fundo redondo, onde se procedeu à evaporação do solvente orgânico até à sua secura total sob uma corrente de árgon. O fino filme lipídico obtido na parede do balão foi

protegido da luz e mantido em alto vácuo durante, pelo menos, 3 horas para garantir a remoção total do solvente. As vesículas multilamelares (MLVs) foram obtidas após a hidratação do filme lipídico em 10 mmol dm^{-3} de tampão HEPES (força iônica ajustada a $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ NaCl, pH 7,4) e vortexadas até garantir a diluição de todo o filme lipídico. Posteriormente, a suspensão foi submetida a 5 ciclos de congelamento/descongelamento: congelação das vesículas em azoto líquido a $-196 \text{ }^\circ\text{C}$ e descongelamento das mesmas num banho de água em ebulição. Durante um período de 30 minutos a suspensão foi colocada num banho termostatizado, com uma temperatura superior à temperatura de transição do lípido, de forma a estabilizar. De seguida, a suspensão de MLVs foi extrudida 10 vezes através de um filtro de policarbonato, com poros de 100 nm de diâmetro, para produzir vesículas unilamelares grandes (LUVs). A extrusão foi realizada sob uma corrente de árgon com uma pressão de 230 bar e com uma temperatura acima da temperatura de transição do sistema lipídico ($\sim 65 \text{ }^\circ\text{C}$). (41)

O tamanho médio dos LUVs foi determinado a $37,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$, recorrendo ao DLS.

5. Condições Experimentais Usadas

A concentração de cada metaloantibiótico usada nos estudos biofísicos foi escolhida de acordo com o respetivo espectro de absorvância UV-Vis (Abs $<0,2$ ao comprimento de onda de excitação). Foram traçados os espectros de nove soluções padrão, para cada metaloantibiótico (gama de concentração entre $\sim 0,5$ e $\sim 30 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$), preparadas por diluições sucessivas de uma solução mãe de metaloantibiótico. Os espectros foram obtidos numa gama de comprimento de onda de 225 a 450 nm.

As concentrações de metaloantibióticos usadas nos estudos biofísicos, bem como os respetivos comprimentos de onda definidos nestas experiências de fluorescência, estão tabelados abaixo.

Tabela 3. Concentração de metaloantibiótico e respectivos comprimentos de onda de excitação (λ_{exc}) e emissão (λ_{emi}) usados na determinação do coeficiente de partição e nos estudos de localização (extinção de fluorescência e anisotropia de fluorescência).

Metaloantibiótico	COEFICIENTE DE PARTIÇÃO		ESTUDOS DE LOCALIZAÇÃO		
	Concentração ($\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)	λ_{exc} (nm)	Concentração ($\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)	Extinção ($\lambda_{exc}/\lambda_{emi}$ (nm))	Anisotropia ($\lambda_{exc}/\lambda_{emi}$ (nm))
CuCpxPhen	5	290	5	290/414	DPH - 360/427
CuLvxPhen	9	350	3	290/458	
CuMxfxPhen	9	290	9	290/468	TMA - 365/426

6. Coeficientes de Partição por Fluorescência em Modo Estacionário

Adicionou-se 1 mL da solução de metaloantibiótico, com uma concentração previamente definida (Tabela 3), numa cuba de quartzo onde foi inserido um micro agitador magnético. Após a aquisição do espectro de emissão desta amostra, adicionaram-se sucessivamente volumes constantes de 8 μL de LUVs diretamente na cuba. A adição terminou quando se atingiu uma concentração final de lípido numa gama de ~ 100 a $\sim 1000 \mu\text{mol dm}^{-3}$. As misturas foram deixadas a incubar, a $37,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 5 minutos obtendo de seguida o espectro de emissão.

As medidas de fluorescência foram repetidas 5 vezes em cada leitura, com uma velocidade de varrimento de 120 nm/min e intervalo de dados de 1 nm. Foram usadas fendas de excitação e emissão de 5 e 10 nm, respetivamente, para os metaloantibióticos da Levofloxacin e Moxifloxacin e fendas de excitação e emissão de 10 e 5 nm para o metaloantibiótico da Ciprofloxacina. Os espectros de fluorescência foram obtidos para um comprimento de excitação a 290 nm e emissão no intervalo de 300 a 550 nm para os metaloantibióticos da Ciprofloxacina e Moxifloxacin e excitação de 350 nm e intervalo de emissão de 360 a 550 nm para o metaloantibiótico da Levofloxacin.

Para cada solução de metaloantibiótico foram realizados, no mínimo, 3 ensaios independentes. Os dados da fluorescência foram analisados recorrendo ao programa Origin 8.0.

7. Estudos de Localização Membranar

7.1 Extinção de Fluorescência por Fluorescência Resolvida no Tempo

Foram preparados quatro conjuntos de amostras, cada um com onze microtubos com um volume final de 1,5 mL. Três dos conjuntos foram preparados com um volume conhecido de metaloantibiótico (Tabela 3), um volume adequado de LUVs (250, 500 e 750 $\mu\text{mol dm}^{-3}$) e de agente de extinção (concentração final no intervalo de 0 a 0,5 mol dm^{-3}) em tampão HEPES. O último conjunto, correspondente às referências, foi preparado de maneira idêntica mas sem a suspensão lipídica. Foram individualmente utilizados como agentes de extinção o ião iodeto e a acrilamida. Posteriormente, todas as amostras foram vortexadas durante 1 minuto e incubadas a $37 \pm 0,1$ °C durante 30 minutos.

A determinação dos decaimentos de fluorescência de cada amostra foi realizada a um comprimento de onda de excitação de 290 nm e monitorizada ao comprimento de onda de emissão máxima de cada metaloantibiótico (ver Tabela 3). O perfil da fonte de excitação foi gravado colocando uma solução diluída de LUDOX em água no lugar da amostra.

A análise de dados obtidos foi realizada usando o programa DAS6 Analysis.

7.2 Anisotropia de Fluorescência por Fluorescência em Modo Estacionário

Foi dissolvido extrato total de lipídico de *E. coli* em clorofórmio num balão de fundo redondo e misturado com um volume adequado de solução padrão de DPH ou TMA-DPH, com a razão molar lípido:sonda de 1:300 respetivamente. (17,41)

O solvente foi removido com uma corrente de árgon e o filme lipídico contendo a sonda incorporada foi submetido a vácuo durante um período mínimo de 3 horas. A preparação dos lipossomas seguiu o mesmo procedimento descrito na secção 4.

Um pequeno volume da solução de metaloantibiótico foi adicionada à suspensão lipossômica (Tabela 3), de modo a obter uma concentração final de lípido de 2 mM em tampão HEPES, para um volume total de 1 mL numa cuba de quartzo contendo um micro agitador magnético.

A anisotropia foi registada por incrementos de 3 °C na gama de temperaturas de 3 a 80 °C, ficando a estabilizar durante 5 minutos em cada temperatura. O comprimento de onda de excitação para o DPH foi fixado a 365 nm e o comprimento de onda de emissão foi 426 nm, enquanto para o TMA-DPH os valores correspondentes foram 360 nm e 427 nm. Foram realizados, no mínimo, dois ensaios independentes para cada amostra.

Os dados experimentais foram tratados recorrendo ao programa Origin 8.0.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tem sido demonstrado que, a nível molecular, as quinolonas e os respetivos metaloantibióticos interagem de forma distinta com sistemas modelo de membranas bacterianas. A porina OmpF tem um papel importante na entrada de algumas quinolonas mas a via mediada por lípidos é igualmente reivindicada por alguns destes antibióticos. A diferença destas vias está diretamente relacionada com a hidrofobicidade das quinolonas. (2) Mutações nesta porina comprometem a entrada desta classe de antibióticos na célula bacteriana constituindo um dos principais mecanismos de resistência a FQs. Porém, é esperado que os metaloantibióticos, devido à sua carga global positiva a pH fisiológico, sejam sensíveis aos lípidos da membrana. (1,5) A sensibilidade esperada por estes agentes catiónicos pode favorecer uma via de influxo capaz de superar o mecanismo de resistência por mutações nas porinas. (11,43,57)

Desde a sua descoberta que os lipossomas são reconhecidos como modelos adequados para mimetizar membranas biológicas. (102) A interação dos agentes antimicrobianos com lipossomas ajuda a esclarecer o papel do ambiente lipídico no transporte destes antibióticos *in vivo*. (5,17) Neste trabalho, a determinação da partição e localização dos metaloantibióticos da Ciprofloxacina, Levofloxacina e Moxifloxacina com lipossomas unilamelares de extrato total de *E. coli*, permitiu especular acerca do possível mecanismo de entrada destes novos derivados de FQs na célula bacteriana. O coeficiente de partição dos metaloantibióticos foi determinado efetuando medidas espectroscópicas diretamente na suspensão lipossómica. Os estudos de localização foram realizados por extinção de fluorescência e anisotropia de fluorescência.

1. Coeficientes de Partição

A partição em membranas é muito relevante para diversos solutos, especificamente para as fluoroquinolonas, que antes de exercerem o seu mecanismo de ação, têm de penetrar nas células bacterianas. (4,117) A interação dos agentes antimicrobianos com um sistema modelo membranar é geralmente avaliada pela determinação do coeficiente de partição (K_p) e pode ser quantificado em suspensões lipossoma/antibiótico através de técnicas espectroscópicas. (5) Assim, no início de um estudo biofísico, a determinação do coeficiente de partição é fundamental uma vez que permite avaliar de forma quantitativa a distribuição de um fármaco em sistemas membranares. (43,117)

O sistema bifásico octanol/água era tradicionalmente usado como padrão de lipofilicidade para avaliar os coeficientes de partição (K_{ow}). (15,17) Contudo, o octanol, não é um bom modelo mimético de membranas, uma vez que não tem em conta as contribuições hidrofóbicas e as interações eletrostáticas entre os lípidos, que são um fator decisivo no caso de solutos carregados. (17,118,119) Atualmente, os sistemas bifásicos consistem em misturas de fosfolípidos carregados e neutros usados como sistemas modelos membranares onde as todas estas contribuições são tidas em conta. (117) Os lipossomas, desde a sua descoberta, têm sido reconhecidos como modelos biomembranares úteis devido à sua semelhança estrutural com as mesmas a vários níveis. (102,103) Deste modo, a determinação do K_p é dependente apenas da quantidade de soluto em interação com a membrana, desde que a quantidade de soluto seja conhecida. (117)

Tendo em conta esta informação, iniciou-se este trabalho pela determinação da interação dos complexos metálicos das fluoroquinolonas, nomeadamente pelo complexo da Ciprofloxacina (Cu(II)/cpx/phen), Levofloxacina (Cu(II)/lvx/phen) e Moxifloxacina (Cu(II)/mxfx/phen), com lipossomas unilamelares de extrato total de *E. coli* através de espectroscopia de fluorescência em modo estacionário. As propriedades fluorescentes dos metaloantibióticos permitem determinar diretamente os coeficientes de partição por espectroscopia de fluorescência, não sendo necessário recorrer a sondas fluorescentes. (1,5-7) Além disso, como as membranas biológicas tipicamente não têm fluorescência intrínseca (109), todas as alterações são provenientes de modificações do meio envolvente do fluoróforo em análise.

1.1 Caracterização Espectroscópica UV-Visível

O passo inicial do trabalho consistiu em garantir a formação de cada metaloantibiótico quando obtido pela mistura estequiométrica dos seus componentes (1:1:1), bem como escolher a concentração de metaloantibiótico apropriada para os estudos biofísicos. Esta informação foi obtida pela análise do espectro de UV-Visível de cada solução de complexo preparada. A determinação da absorção de uma amostra ao comprimento de onda de excitação a usar é de extrema importância uma vez que permite determinar o intervalo de concentrações adequado a utilizar nos ensaios de fluorescência, de forma a minimizar o efeito de filtro interno ($Abs < 0,2$). O espectro de absorção do complexo $[Cu(II)/lvx/phen]$ está representado na Figura 26, a título de exemplo do estudo efetuado para os três metaloantibióticos.

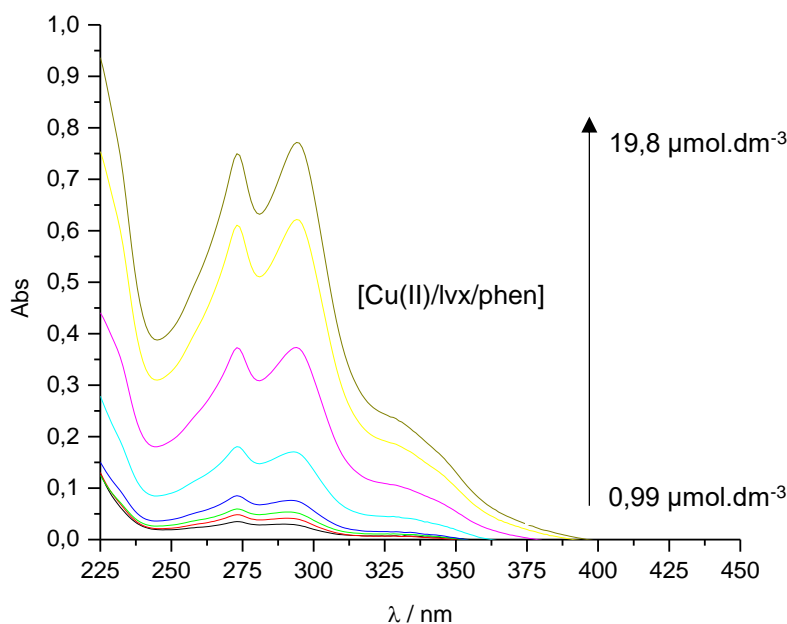


Figura 26. Espectro de absorção das soluções de $[Cu(II)/lvx/phen]$ em tampão HEPES (pH 7,4) com concentrações crescentes de complexo (0,99, 1,485, 2,475, 4,95, 9,9, 15,84 e 19,8 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$).

O espectro de absorção do metaloantibiótico da Levofloxacin foi obtido em solução aquosa (tampão HEPES). O espectro exibe bandas a ~ 274 e ~ 294 nm, bem como uma inflexão no intervalo $\sim 320 - 360$ nm. Este espectro está concordante com os espectros já anteriormente descritos para este complexo, bem como com as características espectrais típicas dos complexos metálicos das fluoroquinolonas. (7,21,22,37,69,82,96,120,121) As bandas UV-Vis características dos metaloantibióticos e respectivas FQs na forma livre estão

representados na Tabela 4. Em todos os casos, as FQs apresentam uma banda de absorção característica à volta de 270-290 nm e uma ou duas bandas mais baixas à volta de 300-320 nm. No caso dos metaloantibióticos, as bandas dos espectros UV-Vis obtidos exibem um ligeiro desvio do comprimento de onda máximo comparado com o espectro das FQ e fenantrolina livres, o que indica a formação do complexo de acordo com observações anteriores. (25,69,95,96) Além disso, a banda de menor intensidade na gama ~320–360 nm característica nos espectros dos complexos já foi anteriormente atribuída a uma transição eletrónica de transferência de carga da quinolona para o metal. (7,22,96) Deste modo, o estudo espectroscópico dos complexos formados em solução quando misturados em proporções estequiométricas (1:1:1) permitiu confirmar a coordenação do catião metálico divalente pela exibição de bandas características. Esta caracterização espectroscópica das soluções de metaloantibióticos, quer por mistura de componentes quer por dissolução do sal, foi sempre monitorizada previamente à sua utilização. Foram observadas mudanças espectrais para um período superior a 3 dias, o que sugere que o complexo não é estável em solução para longos períodos de tempo.

Tabela 4. Bandas de absorção de UV-Vis características para as FQs e os respetivos metaloantibióticos. (4)

Agente antimicrobiano	$\lambda_{\text{máximo}}$ (nm)		
lvx	292	-	328
[Cu(II)/lvx/phen]	274	294	320-340
cpx	276	-	318
[Cu(II)/cpx/phen]	274	320	~318-368
mxfx	292	-	336
[Cu(II)/mxfx/phen]	272	294	~318-368

Tendo em conta o estudo espectroscópico realizado para o complexo da Levofloxacina (Figura 26), optou-se por usar uma concentração de $\sim 9 \mu\text{mol dm}^{-3}$ para um λ_{exc} de 350 nm na determinação do coeficiente de partição. Para os complexos ternários da Ciprofloxacina e Moxifloxacina (espectros não apresentados), usou-se uma concentração de ~ 5 e $9 \mu\text{mol dm}^{-3}$, respetivamente, para um λ_{exc} de 290 nm. As condições escolhidas estão dentro do limite máximo aceite para o efeito de filtro interno, sendo necessárias para minimizar a dispersão de luz provocada pelos lípidos. Uma vez que o sistema de extrato total de *E. coli* é uma mistura heterogénea, causa turbidez, o que provoca uma dispersão da luz significativamente maior relativamente ao observado em lípidos sintéticos. Esta dispersão de luz leva a um aumento da absorvância onde não existam fluoróforos a absorver radiação, o que conduz a uma diminuição da luz que atinge o detetor. (122) O fenómeno

de dispersão de luz causada pelos lípidos é normalmente maior para menores comprimentos de onda de excitação. (5)

1.2 Determinação do Coeficiente de Partição por Fluorescência em Modo Estacionário

Como já referido, os coeficientes de partição dos metaloantibióticos podem ser obtidos por monitorização dos seus parâmetros de fluorescência em solução aquosa e após a sua incorporação na membrana. Estes foram determinados sem separação de fases da suspensão fármaco/lipossoma. Desta forma, procedeu-se à avaliação da interação de cada um dos metaloantibióticos com LUVs de extrato total de *E. coli*, na ausência e na presença de concentrações crescentes de lipossomas, com um diâmetro médio ~100 nm. Na Figura 27 estão representados os espectros de emissão de fluorescência obtidos para os três metaloantibióticos. Os espectros de fluorescência em modo estacionário de cada solução de metaloantibiótico, às quais foram adicionadas volumes crescentes de suspensão lipossômica, foram traçados e corrigidos do efeito de diluição ao comprimento de onda de emissão máximo de cada metaloantibiótico.

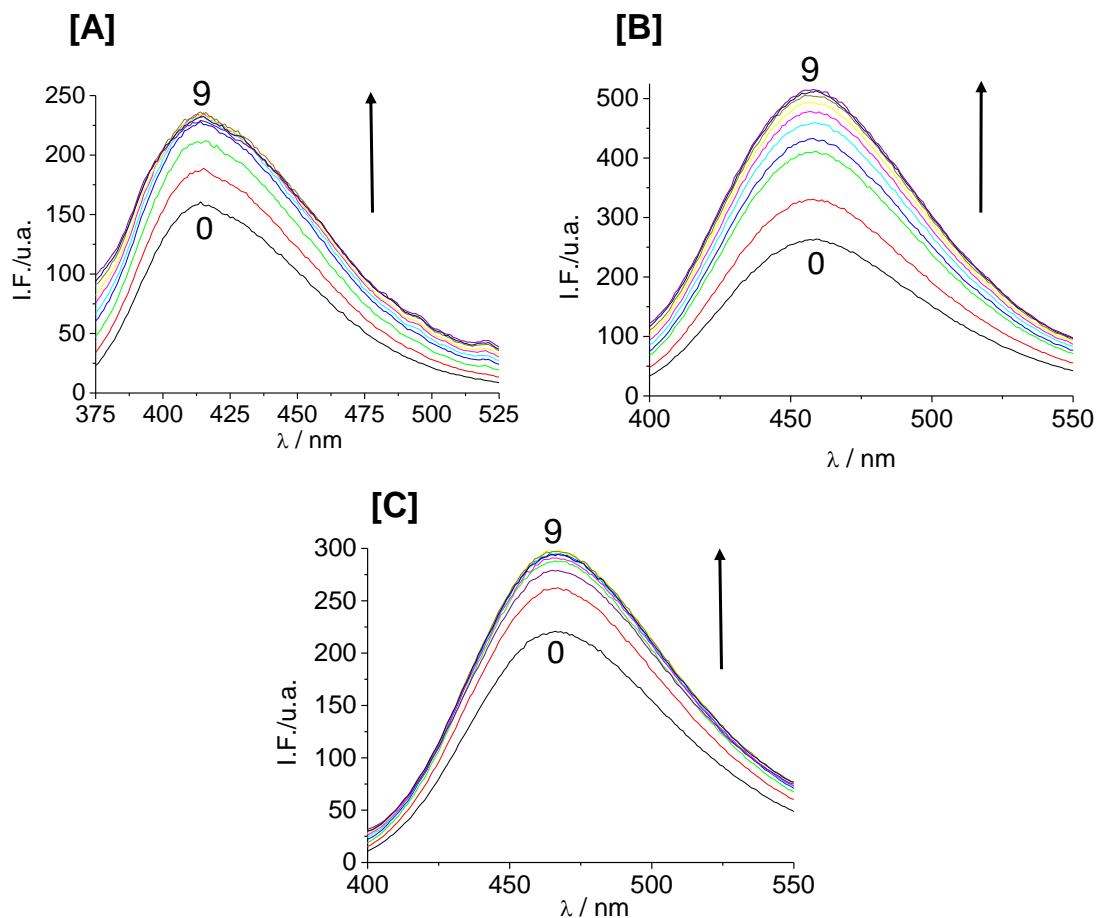


Figura 27. Espectros de emissão de fluorescência obtidos por fluorescência em modo estacionário para os metaloantibióticos: [A] – Cu(II)/cpx/phen ($5 \mu\text{mol dm}^{-3}$; 1:1:1), [B] – Cu(II)/lvx/phen ($9 \mu\text{mol dm}^{-3}$; 1:1:1) e [C] – Cu(II)/mxfx/phen ($9 \mu\text{mol dm}^{-3}$; 1:1:1). O espectro de emissão de fluorescência da solução de metaloantibiótico na ausência (0) e na presença de concentrações crescentes de LUV's de extrato total de *E. coli* (1-9), com comprimento de onda de excitação de 350 nm para o complexo [Cu(II)/lvx/phen] e de 290 nm para os complexos [Cu(II)/cpx/phen] e [Cu(II)/mxfx/phen]. Cada espectro corresponde à média de cinco medições.

Como se pode observar, nos espectros de emissão de fluorescência obtidos para os metaloantibióticos, verifica-se que nos três casos a intensidade de fluorescência (I.F.) aumenta com o aumento da concentração de lípido. Este aumento da I.F. do metaloantibiótico na presença de LUVs de extrato total de *E. coli* é indicador de um novo ambiente químico ao redor dos fluoróforos, visto que as suas propriedades de fluorescência dependem fortemente do meio envolvente. Segundo a literatura, este efeito é oposto aquele que acontece para a FQ na forma livre, onde se observa uma diminuição da I.F. Este fenómeno é atribuído à diminuição da concentração da FQ em solução aquosa e ao aumento da sua partição no sistema membranal. (1,5) O comportamento oposto entre o metaloantibiótico e a respetiva FQ também já foi detetado para a Enrofloxacin e o seu complexo metálico, e para algumas FQs em diferentes solventes polares e/ou em diferentes misturas de solventes orgânico-aquosos. (1,5,6)

O aumento da I.F. com o aumento da concentração lipídica tem sido atribuída a alterações no momento dipolar da molécula que ocorre devido a transições eletrônicas resultantes de interações específicas entre soluto e solvente e que influenciam ambos os acoplamentos radiativos e não-radiativos entre o estado fundamental e excitado. (123-126) Este facto está relacionado com a partição dos metaloantibióticos num ambiente mais hidrofóbico. (17) Deste modo, as mudanças espectrais observadas na Figura 27 resultam de interações metaloantibiótico-lípido que podem ser usadas na determinação do K_p , uma vez que os sinais provenientes de fenómenos de dispersão dos lipossomas não interferem com os perfis espectrais sob as condições experimentais usadas.

Os dados experimentais de fluorescência foram analisados por ajuste da equação 9, usando o programa Origin 8.0, ao comprimento de onda de emissão máxima de cada metaloantibiótico (CuLvxPhen: $\lambda_{em} = 458$ nm; CuCpxPhen: $\lambda_{em} = 414$ nm; CuMxfxPhen: $\lambda_{em} = 468$ nm). O valor de ΔI é calculado pela diferença de intensidade de fluorescência dos metaloantibióticos em tampão HEPES e na presença de concentrações crescentes de lípido [L]. O tratamento gráfico de $\Delta I = f[L]$ está representado na Figura 28.

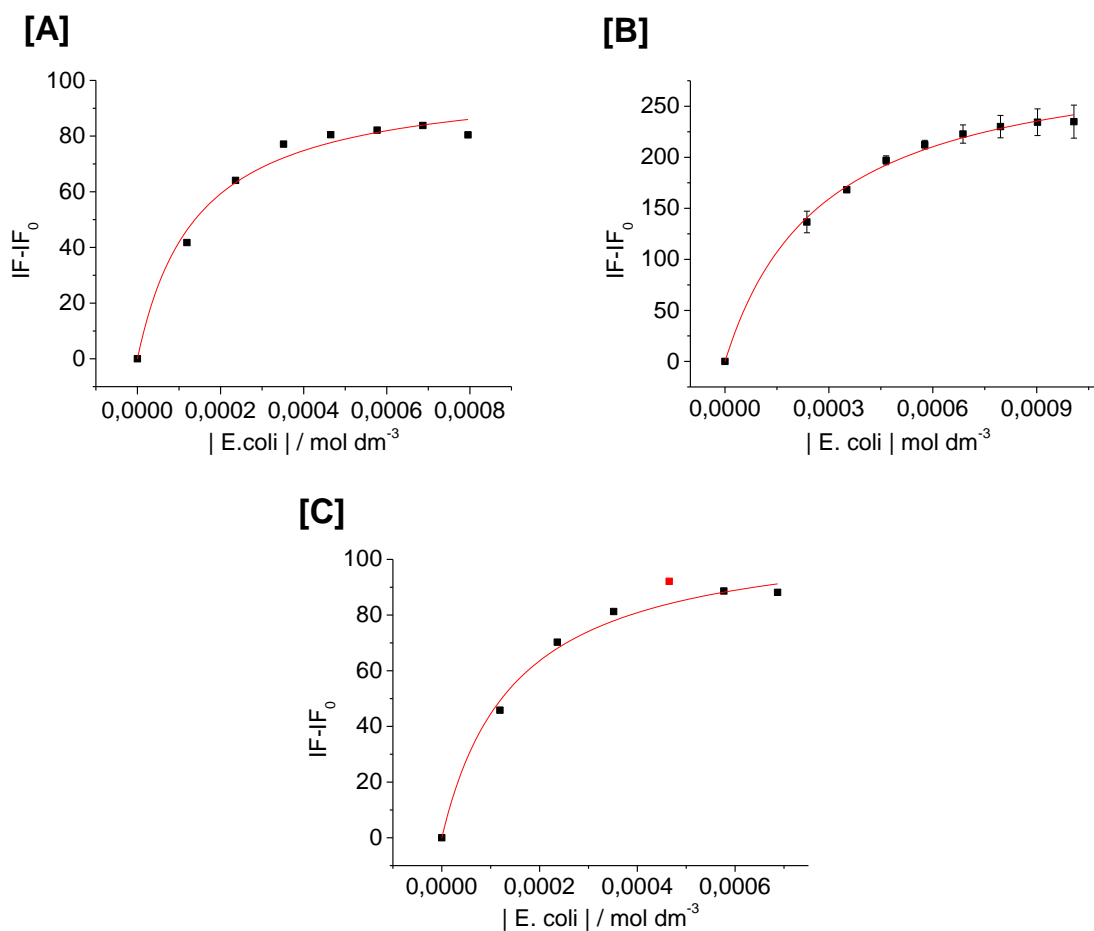


Figura 28. Ajuste não linear dos dados espectrofotométricos (equação 9) obtidos ao comprimento máximo de emissão de [A] – [Cu(II)/cpx/phen] a 414 nm, [B] – [Cu(II)/lvx/phen] a 458 nm e [C] – [Cu(II)/mxfx/phen] a 468 nm, em concentrações crescentes de LUV's de extrato total de *E. coli*.

Os valores dos coeficientes de partição, K_p , determinados com a equação 9 para as concentrações de metaloantibióticos definidas na secção 1.1 (9, 5 e 9 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ para CuLvxPhen, CuCpxPhen e CuMxfxPhen, respetivamente), estão sumariados na Tabela 5. Nesta Tabela encontram-se ainda os valores do coeficiente de partição encontrados na literatura para as respetivas FQs na forma livre.

Tabela 5. Coeficientes de partição obtidos para os metaloantibióticos da Ciprofloxacina, Levofloxacina e Moxifloxacina com LUVs de extrato total de *E. coli*, obtidos por fluorescência em modo estacionário, determinados a $\lambda_{em} = 414; 458$ e 468 nm, respetivamente, pela aplicação da equação 9.

Extrato total de <i>E. coli</i>	CuCpxPhen	Cpx	CuLvxPhen	Lvx	CuMxfxPhen	Mxfx
log K_p	$5,49 \pm 0,08^{(a)}$	$4,21 \pm 0,01^{(5)}$	$5,32 \pm 0,04^{(a)}$	$4,55 \pm 0,02$	$5,60 \pm 0,09^{(a)}$	$4,15 \pm 0,02^{(1)}$
$(\lambda_{exc}/\lambda_{emi}; \text{nm})$	(350/458)		(290/414)		(290/468)	

(a) Os valores apresentados com o respetivo desvio-padrão resultam na média de, pelo menos, três ensaios independentes.

Os valores do coeficiente de partição obtidos mostram que os metaloantibióticos têm uma afinidade mensurável no sistema de extrato total de *E. coli*, por espectroscopia de fluorescência em modo estacionário. A partir da análise da Tabela 5 verifica-se que o valor do logaritmo do coeficiente de partição ($\log K_p$) dos três metaloantibióticos é semelhante, a menos do erro experimental. O valor obtido para CuCpxPhen foi semelhante ao encontrado na literatura com a mesma técnica, onde $\log K_p$ é $5,32 \pm 0,09$. (5) Por outro lado, para CuMxfxPhen o valor obtido foi mais alto relativamente ao valor encontrado na literatura, onde $\log K_p$ é $4,74 \pm 0,02$. (1) Também para o CuLvxPhen o valor determinado foi mais significativo relativamente ao obtido para este complexo no nosso laboratório, onde $\log K_p$ foi de $4,26 \pm 0,04$ (comunicação do grupo do laboratório). Visto que o sistema membranar de extrato total de *E. coli* é composto por uma mistura heterogénea de fosfolípidos, acompanhados por uma porção significativa de componentes hidrofóbicos, isto evita a discussão sobre a influência das diferentes percentagens de PE:PG na partição dos metaloantibióticos (lípidos na forma ião-dipolar e aniónica, respetivamente). Os valores de $\log K_p$ determinados neste trabalho corroboram os valores de $\log K_p$ obtidos no nosso laboratório através de ressonância plasmónica de superfície (SPR). Os valores de $\log K_p$ determinados por SPR são de $5,28 \pm 0,10$ para CuCpxPhen, $5,23 \pm 0,10$ para CuLvxPhen

e $5,37 \pm 0,10$ para CuMxfxPhen (resultados não publicados). Esta técnica foi realizada com o sistema *Biacore X-100*, onde foi monitorizada a ligação entre os lipossomas, ancorados a um chip sensor (L1), e os metaloantibióticos. Desta interação resultou uma alteração do índice de refração à superfície do chip sensor, que é vista como um aumento do sinal de SPR. (127) Comparando agora o valor do $\log K_p$ do metaloantibiótico e da respetiva FQ (Tabela 5) verifica-se que, nos três casos, o metaloantibiótico tem uma interação maior com LUVs de extrato total de *E. coli* relativamente à FQ na forma livre. Este resultado era espectável tendo em conta as características físico-químicas dos metaloantibióticos quando comparados com as FQs livres. Considerando o sistema membrana lipídica utilizado (extrato total de *E. coli*), sabe-se que este é composto por uma mistura de diferentes fosfolípidos, na forma aniónica e de ião-dipolar, juntamente com uma fração de componentes hidrofóbicos desconhecidos. (1) É esperado que haja repulsão, interação eletrostática moderada ou atração com os grupos presentes na cabeça dos fosfolípidos, consoante as espécies de antibiótico se encontrem na forma aniónica, ião-dipolar ou catiónica. (1,6)

A síntese e os estudos de especiação de metaloantibióticos mostram que só os complexos cobre/fluoroquinolona/fenantrolina são estáveis sob condições fisiológicas. (4,5,7,22) A constante de estabilidade para o Cu^{2+} na formação dos complexos ternários das FQs já foram determinadas por Feio *et al.* 2014 e encontram-se sumariadas na Tabela 2. (4) Os estudos de especiação realizados para os complexos (Cu:HFQ:Phen na razão molar 1:1:1) em questão demonstram a coexistência das duas espécies ternárias carregadas positivamente descritas pelas equações 1 e 2. O comportamento em solução, ao valor de pH fisiológico, mostrou a predominância das seguintes espécies: $[\text{CuLvxFen}]^+$ 57% e $[\text{CuHLvxFen}]^{2+}$ 38,5% para o metaloantibiótico da Levofloxacina ($9 \mu\text{mol dm}^{-3}$), $[\text{CuCpxPhen}]^+$ 3% e $[\text{CuHCpxPhen}]^{2+}$ 97% para o metaloantibiótico da Ciprofloxacina ($5 \mu\text{mol dm}^{-3}$) e $[\text{CuMxfxPhen}]^+$ 16,1% e $[\text{CuHMxfxPhen}]^{2+}$ 82,7% para o metaloantibiótico da Moxifloxacina ($9 \mu\text{mol dm}^{-3}$). HFQ e FQ representam o antibiótico na sua forma de ião dipolar e aniónica, respetivamente. Estes resultados sugerem que a partição dos metaloantibióticos é altamente sensível à carga global do sistema lipídico. A elevada percentagem de lípidos carregados negativamente promove interações eletrostáticas com as espécies carregadas positivamente de metaloantibióticos a pH fisiológico. (1,5,6)

Analisando o $\log K_p$ das FQs na forma livre verifica-se que este difere entre as três FQs e aumenta na seguinte ordem: Mxfx < Cpx < LvX, FQs de 4^a, 2^a e 3^a geração respetivamente. As diferenças no valor do coeficiente de partição refletem a estrutura química dos grupos substituintes dos antibióticos (Figura 2), que podem alterar significativamente as

propriedades de biodisponibilidade. (15,17) Estes grupos alteram os valores de pK_a das FQs e, conseqüentemente, a carga das espécies em solução. (17) Como anteriormente mencionado, as FQs têm dois grupos funcionais ionizáveis, um grupo ácido na posição 3 do núcleo da quinolonas e um grupo básico na posição 7 (Figura 3), o que lhes confere um caráter anfotérico. (1,4-8,17,19) Dependendo do pH do meio, o comportamento farmacológico das FQs é influenciado devido à protonação/desprotonação destes grupos. A pH 7,4 as quinolonas encontram-se total ou parcialmente ionizadas, sendo a espécie predominante a forma de íão-dipolar/neutra (HQ^{\pm}/HQ^0) podendo coexistir com as formas aniônica (FQ^-) e catiônica (H_2FQ^+). (15,19) Avaliando as constantes de acidez (pK_a) das três FQs (Tabela 6) (4) verifica-se que, embora exista similaridade entre elas, há simultaneamente pequenas diferenças. Estas diferenças são suficientes para influenciar as propriedades ácido-base das FQs e determinar as espécies existentes em solução, tendo um impacto importante ao valor do pH fisiológico. As espécies predominantes a pH 7,4 são a forma de 82% íão-dipolar/neutra e 14,6% aniônica e 3,4% catiônica para a Levofloxacina, 90% de íão-dipolar/neutra e 10% aniônica para a Ciprofloxacina e, 93% íão-dipolar/neutra e 7% catiônica para a Moxifloxacina. Uma vez que a forma aniônica é repelida pelos lípidos carregados negativamente e a percentagem de forma catiônica é bastante reduzida, o fator crucial parece estar relacionado com a natureza anfotérica da forma de íão-dipolar/neutra das FQs (Figura 29). (128)

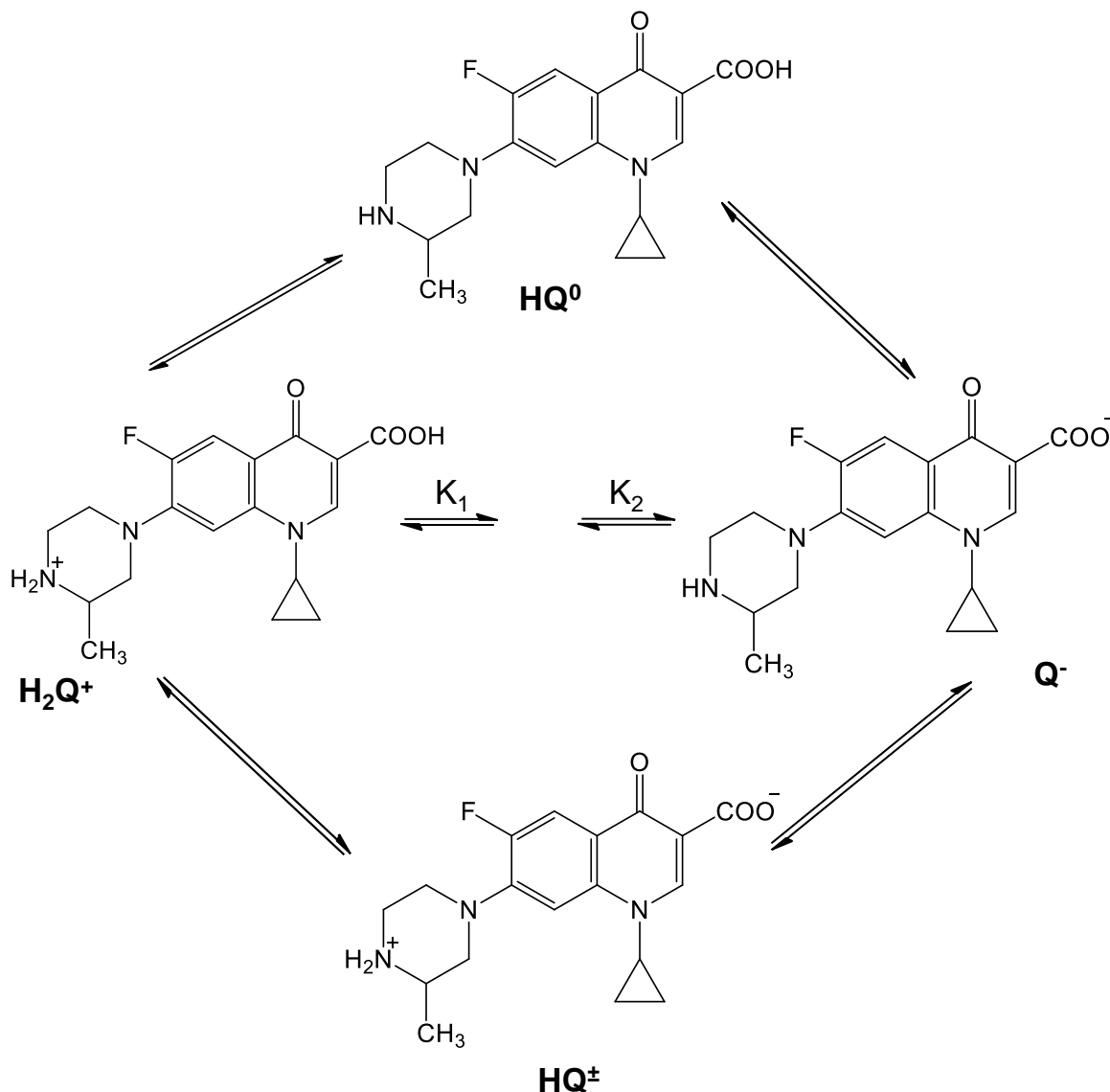


Figura 29. Esquema da dissociação de uma FQ artificial (CNV-8912). (Adaptada de (128))

Na Figura 29 está representado o equilíbrio de protonação múltipla das FQs em solução, tendo em conta os dois locais de ligação de protão. Se se considerar o microequilíbrio entre as formas de ião-dipolar e neutra, a diferente interação das FQs com os LUVs de *E. coli* é melhor entendida, uma vez que se admite que a forma neutra permeia muito mais facilmente a bicamada que a forma de ião-dipolar. (128) A proporção destas duas microespécies pode ser estimada através da combinação das macroconstantes de protonação (K_{a1} e K_{a2}), usadas para determinar o rácio de forma ião-dipolar/neutra ($HQ^{\pm}/HQ^0 = 10^{pKa2}/10^{pKa1}$). (128) Os valores de pKa e o rácio entre as espécies de ião-dipolar e neutra de cada FQ estudada estão representadas na Tabela 6.

Tabela 6. Valores de pKa (média \pm desvio-padrão) (4) e rácio das espécies ião-dipolar/neutra.

	Ciprofloxacina	Levofloxacina	Moxifloxacina
pKa₁	6,18 \pm 0,05	6,02 \pm 0,02	6,23 \pm 0,02
pKa₂	8,76 \pm 0,03	8,15 \pm 0,04	9,53 \pm 0,03
[HQ[±]]/[HQ⁰]	380,2	134,9	1995,3

Como é possível verificar pela análise da Tabela 6, a concentração da forma neutra é maior para a Levofloxacina, enquanto a forma de ião-dipolar é maior para a Moxifloxacina. Isto sugere que o simples mecanismo de difusão através da bicamada pode ser dependente da proporção de cada microespécie presente. (128) O carácter lipofílico de um fármaco, revelado pelo coeficiente de partição, é normalmente aceite como uma medida da afinidade aos fosfolípidos. Hipoteticamente, o maior valor de K_p é indicativo de uma maior tendência das FQs se incorporarem nos lipossomas, nas condições utilizadas. (128) A maior quantidade de forma neutra para a Levofloxacina favorece a sua interação com a membrana, o que justifica que esta FQ possua o maior valor de K_p . Por outro lado, a maior quantidade de forma de ião-dipolar para a Moxifloxacina induz uma interação mais fraca com a membrana e, por isso, um menor valor de K_p .

Os coeficientes de partição determinados para os metaloantibióticos podem ainda ser comparados com os obtidos na literatura referentes a células eucarióticas, os quais evidenciam uma partição praticamente nula em lipossomas de DMPC (lípidos na forma de ião-dipolar/neutra). Contrariamente, as FQs livres em solução têm uma interação relevante com estas vesículas. (1,5,6) Tendo em consideração que a fosfatidilcolina (PC) é o principal constituinte do folheto externo das membranas plasmáticas de mamíferos, os resultados obtidos para os metaloantibióticos apontam para um potencial aumento da seletividade das membranas bacterianas com efeitos colaterais mínimos para o hospedeiro relativamente às respetivas FQs.

1.3 Conclusões

A análise quantitativa da partição dos metaloantibióticos [Cu(II)/cpx/phen], [Cu(II)/lvx/phen] e [Cu(II)/mxfx/phen] em LUVs de extrato total de *E. coli* foi semelhante, sugerindo que as interações lipossomas-metaloantibióticos são sensíveis à carga total do sistema membranar. Uma vez que a pH fisiológico as espécies de metaloantibióticos existentes têm carga positiva (+ ou 2+), rapidamente interagem com os grupos carregados negativamente dos fosfolípidos. Esta interação pode potencializar o influxo do fármaco na célula bacteriana, constituindo um mecanismo de entrada diferente relativamente aos antibióticos na forma livre. Ao valor de pH 7,4 apenas algumas FQs são capazes de se difundir através da bicamada devido ao seu carácter lipofílico e à sua forma não carregada (neutra). Várias evidências apontam a via porínica (mais concretamente a OmpF) como sendo a principal via de entrada das FQs na célula bacteriana. (1,2,33) A interação FQ/OmpF aumenta a partir da primeira geração de quinolonas, um fator que está diretamente relacionado com a hidrofobicidade das FQs. Em termos moleculares, admite-se que a FQ penetra perfeitamente o canal porínico na forma de íão-dipolar e interage simultaneamente com resíduos carregados negativamente e positivamente presentes nesta estrutura.

Os resultados do coeficiente de partição obtidos para os metaloantibióticos são bastante promissores, visto que o sistema membranar de extrato total de *E. coli* é obtido diretamente pela extração da componente lipídica da bactéria, tornando-o um sistema mais aproximado do real e mais complexo. Além disso, o sistema lipídico usado está desprovido de porinas mimetizando a membrana externa de bactérias resistentes.

2. Estudos de Localização Membranar

Os fármacos devem ter uma partição bem definida nas membranas lipídicas, tal como uma localização, orientação e conformação energeticamente favorável antes de atingirem o seu alvo intracelular. A compreensão sobre o seu eventual mecanismo de entrada nas células pode ser obtido a partir do estudo do coeficiente de partição e localização em modelos membranares. Os lipossomas conseguem mimetizar o ambiente químico e estrutural das membranas celulares. Porém, são desprovidos da maquinaria de transporte – porinas. (129)

A determinação dos coeficientes de partição permite obter uma abordagem sobre a interação dos metaloantibióticos com o modelo mimético da membrana externa de *E. coli*, na medida em que é possível a sua quantificação. No entanto, o coeficiente de partição não contém qualquer tipo de informação acerca da localização do soluto na membrana. (117) Assim, com o objetivo de determinar se esta ocorre a um nível superficial, devido a uma orientação molecular e consequente adsorção da molécula à fase lipídica, ou se efetivamente o fármaco se difunde através da bicamada localizando-se numa zona mais profunda da membrana, foram realizados estudos de localização. Os estudos realizados neste trabalho incluíram extinção de fluorescência e anisotropia de fluorescência. A aplicação destas técnicas permite obter informação não só acerca da inserção e localização de fármacos em lipossomas mas também sobre a fluidez da membrana. (17,109,129) A extinção de fluorescência é uma técnica que permite obter informação sobre o sistema químico no qual o metaloantibiótico se encontra, tendo em conta a sua acessibilidade ao agente de extinção. Por outro lado, a anisotropia de fluorescência permite obter informações sobre vários ambientes membranares através do comportamento reportado por sondas com uma localização específica. (109)

Outra informação importante que advém dos estudos de localização dos metaloantibióticos é a possível contribuição das componentes hidrofóbicas como forma de controlar a extensão ou a orientação de inserção, que poderá melhorar a interação eletrostática. (129) Com a combinação entre os valores de partição e os resultados dos estudos de localização, torna-se possível avaliar o papel das propriedades eletrostáticas/hidrofóbicas dos lípidos na incorporação e localização de metaloantibióticos. (102,129)

2.1 Extinção de Fluorescência por Fluorescência Resolvida no Tempo

A localização membranar dos metaloantibióticos, moléculas fluorescentes, pode ser obtida a partir da sua extinção de fluorescência com agentes de extinção. (17,129) Os fenómenos de extinção de fluorescência requerem o contacto molecular entre o agente de extinção e o fluoróforo, revelando assim a acessibilidade dos fluoróforos aos agentes de extinção em ambientes distintos. (36,109) Para os estudos de localização em LUVs de extrato total de *E. coli* dos metaloantibióticos foram escolhidos dois agentes de extinção solúveis em água, o ião iodeto e a acrilamida, de forma a garantir a eficiência da experiência de extinção.

O ião iodeto sendo um ião hidrossolúvel, faz sentir o seu efeito nas propriedades fluorescentes do fármaco, fundamentalmente, na fração disponível na fase aquosa. No entanto, o seu movimento Browniano pode permitir a sua entrada e saída da membrana. Neste processo o ião iodeto pode colidir e extinguir o fluoróforo. Naturalmente que quanto mais embebido na membrana o fármaco estiver, menor é a probabilidade de o I^- alcançar. (130) Desta forma, a extinção pelo ião iodeto fornece informação acerca da profundidade relativa do fluoróforo ligado à membrana.

O fenómeno de extinção de fluorescência foi analisado por espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo, onde qualquer artefacto causado pela presença da dispersão significativa de luz proveniente da suspensão lipossómica é completamente evitada. (131)

O tempo de vida é uma propriedade molecular do fármaco sendo, por isso, uma medida absoluta. (5)

A extinção de fluorescência dos metaloantibióticos na ausência e na presença de três concentrações LUVs de extrato total de *E. coli* (250, 500 e 750 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) foi observada pela medida dos decaimentos de intensidade dos metaloantibióticos, num intervalo de [KI] selecionado (0,05 a 0,50 M) ao comprimento de onda de emissão máximo e com um LED de excitação de 290 nm. Os tempos de vida de fluorescência (τ), dos decaimentos medidos, foram obtidos utilizando um modelo de decaimento pré-definido através do programa DAS6 Analysis como se pode observar na Figura 30. Este modelo baseia-se no método de convolução de ajuste não linear dos mínimos quadrados e apenas uma exponencial foi necessária para o ajuste. A função exponencial foi escolhida tendo em conta o valor de $\chi^2 < 2.0$, erros ponderados e gráficos de auto-correlação.

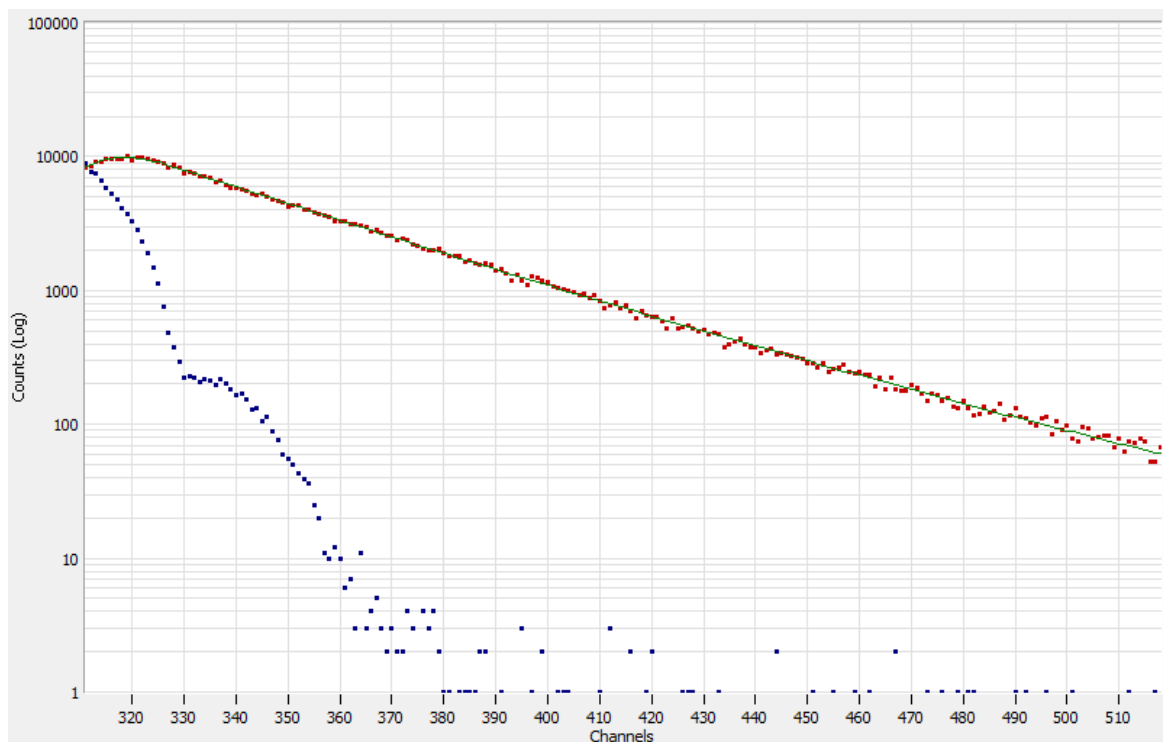


Figura 30. Representação do tratamento de dados no programa DAS6 Analysis do decaimento de intensidade de fluorescência em espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo do complexo [Cu(II)/lvx/phen] na presença de LUV's de extrato total de *E. coli* ($\sim 250 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$). A linha azul à esquerda representa o LUDOX e a linha vermelha do lado direito representa o perfil de decaimento ajustado com uma função de uma exponencial (linha verde) para o intervalo de canais selecionado.

Os dados experimentais obtidos com o DAS6 Analysis para os metaloantibióticos, na ausência (τ_0) e na presença (τ_1 até τ_{10}) de concentrações crescentes de KI, foram tratados por um método gráfico linear usando a equação 5, ao comprimento de intensidade máxima, com o programa Origin 8.0. Na Figura 31 estão representados os tratamentos gráficos dos dados do tempo de vida de fluorescência dos metaloantibióticos em HEPES na presença de concentrações crescentes de KI, para uma concentração total de 5, 3 e $9 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ para o complexo da Ciprofloxacina, Levofloxacina e Moxifloxacina, respectivamente.

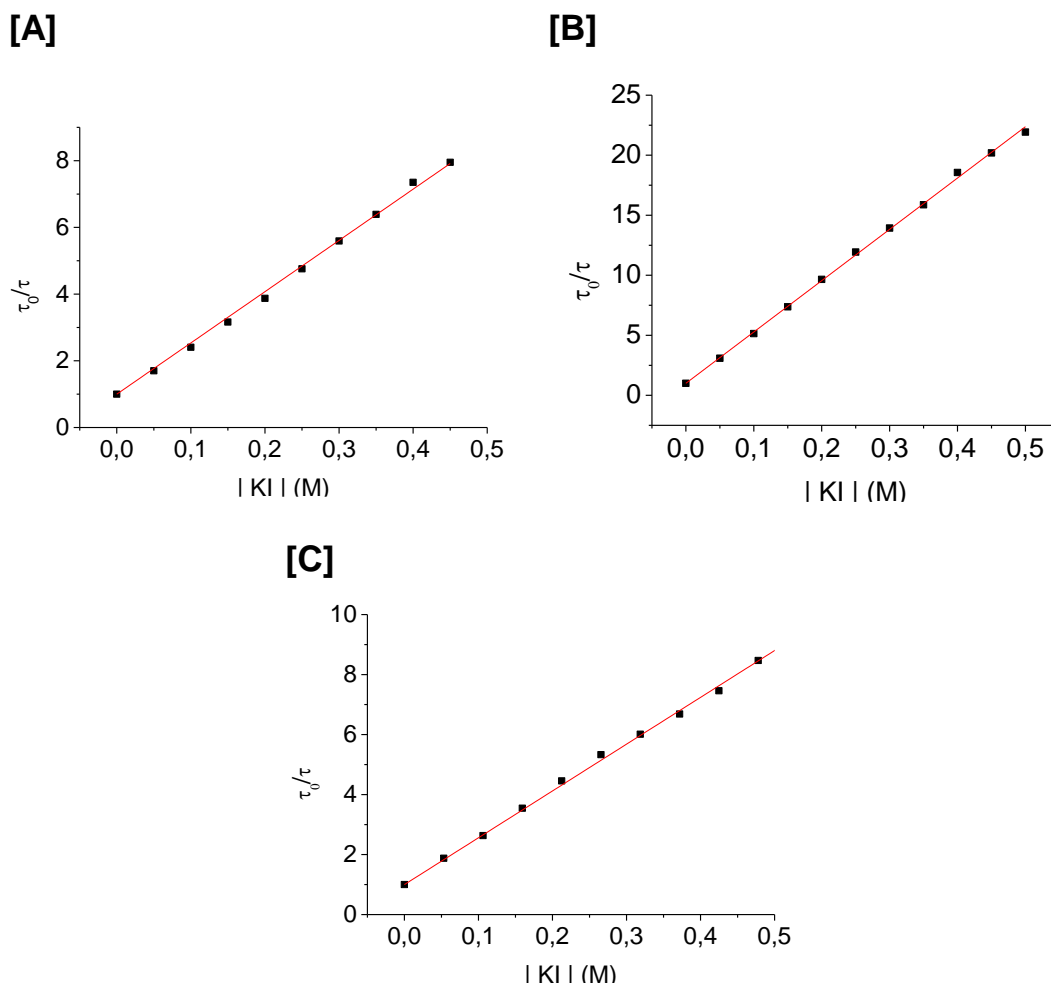


Figura 31. Ajuste linear dos dados do tempo de vida de fluorescência (equação 5) obtidos ao comprimento máximo de emissão de [A] – [Cu(II)/cpx/phen] a 414 nm, [B] – [Cu(II)/lvx/phen] a 458 nm e [C] – [Cu(II)/mxfx/phen] a 468 nm, em concentrações crescentes de KI em tampão HEPES (pH 7.4). As intensidades de fluorescência foram obtidas por um LED com excitação a 290 nm.

As constantes de Stern-Volmer (k_{sv}) para a extinção de fluorescência dos metaloantibióticos pelo ião iodeto foram determinadas a partir do declive da reta obtida para cada ensaio. A linearidade do gráfico da equação de Stern-Volmer observada na Figura 31 é indicativa de que todos os fluoróforos estão igualmente acessíveis ao agente de extinção quando livres em solução. (17,109,129) Na Tabela 7 encontram-se representados os valores de k_{sv} , determinados a partir da equação 5, e o respectivo desvio-padrão para cada metaloantibiótico, pela extinção da intensidade fluorescência do iodeto, na ausência e presença de vesículas unilamelares de extrato total de *E. coli* para diferentes concentrações de lípido usadas (250, 500 e 750 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$). Os valores de k_{sv} foram obtidos usando a intensidade de fluorescência ao comprimento de onda de emissão máximo (414 458 e 468 nm para o complexo [Cu(II)/cpx/phen], [Cu(II)/lvx/phen] e [Cu(II)/mxfx/phen]

respetivamente). As retas representadas para cada uma das variáveis foram obtidas com um coeficiente de correlação R^2 igual ou superior a 0,98.

Tabela 7. Valores da constante de Stern-Volmer (k_{sv}) para os metaloantibióticos com iodeto na ausência e na presença de diferentes concentrações de LUVs de extrato total de *E. coli* (250, 500 e 750 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) através de espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo. As constantes foram obtidas por um LED com excitação a 290 nm e lidas ao comprimento de emissão máximo para cada metaloantibiótico.

Extrato total de <i>E. coli</i>	k_{sv} (M^{-1})			
	0 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$	250 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$	500 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$	750 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$
[Cu(II)/cpx/phen]	15,36 \pm 0,14	12,72 \pm 0,15	11,23 \pm 0,30	–
[Cu(II)/lvx/phen]	41,59 \pm 0,23	37,64 \pm 1,16	35,37 \pm 1,10	34,80 \pm 1,37
[Cu(II)/mxfx/phen]	15,83 \pm 0,10	15,24 \pm 0,15	14,81 \pm 0,18	15,54 \pm 0,06

Comparando o valor de k_{sv} (Tabela 7) dos três metaloantibióticos na ausência de vesículas lipídicas (0 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$), destaca-se de uma forma significativa o do complexo da Levofloxacina. Esta variação está associada à natureza anfipática destas moléculas. Uma vez que a Levofloxacina é o antibiótico que apresenta a natureza mais polar, o iodeto tem uma maior afinidade por esta.

Pela análise da Tabela 7 verifica-se que, para o metaloantibiótico da Ciprofloxacina e Levofloxacina, o k_{sv} vai diminuindo com o aumento da concentração de lípido. A diminuição da constante de Stern-Volmer na presença de lipossomas reflete um novo ambiente no qual o fármaco se encontra. (109) Quando o metaloantibiótico se encontra livre em solução, todos os fluoróforos se encontram acessíveis ao ião iodeto (como se observa na Figura 31). Já na presença de lípido há uma falta de extinção de fluorescência (diminuição do k_{sv}), que é interpretada como a inacessibilidade do iodeto à zona onde o metaloantibiótico se encontra, uma vez que o k_{sv} reflete a afinidade do fluoróforo ao agente de extinção. (109) Deste modo, os dados experimentais supracitados sugerem que o complexo da Levofloxacina e da Ciprofloxacina se encontram numa zona mais interna da bicamada, uma vez que o ião iodeto extingue a fluorescência de fluoróforos normalmente quando estes se encontram num ambiente mais hidrofílico (pouco profundo). Desta forma, o iodeto como agente de extinção mostra-se eficiente quando estes dois antibióticos se encontram em solução. Porém, a perda de extinção indica a presença do fármaco numa zona inacessível ao iodeto. Estas zonas podem ser o núcleo hidrofóbico ou o espaço interno aquoso do lipossoma. (113)

No caso do complexo da Moxifloxacina, o k_{sv} permanece praticamente constante indicando que este complexo está quase sempre visível ao iodeto. O decréscimo pouco acentuado dos valores de k_{sv} , com o aumento da concentração de lípido, deve-se provavelmente a

uma pequena redução da concentração do metaloantibiótico da Moxifloxacina em HEPES por partição para a fase membrana. Porém, esta leve diminuição no valor de k_{sv} também pode ser atribuída à presença de uma pequena partição do iodeto na fase lipídica. (17) Embora se previsse uma repulsão eletrostática entre o ião iodeto e as cabeças polares do fosfolípido, devido à carga negativa comum, esta será superada não só devido à bicamada se encontrar numa fase mais fluida (experiência a 37 °C) mas também devido à repulsão eletrostática entre as cabeças polares, fatores responsáveis por um menor empacotamento do fosfolípido. (113) Deste modo, este resultado sugere que este complexo da Moxifloxacina se encontra numa parte mais superficial da bicamada.

A acrilamida, uma pequena molécula polar, tem a particularidade da sua eficiência de extinção de fluorescência ser independente da polaridade do microambiente à volta do fluoróforo mas limitada pela possibilidade de ocorrência de efeitos estéreos. (36) Os resultados obtidos (não representados) das experiências de extinção de fluorescência dos metaloantibióticos com a acrilamida em HEPES não mostraram qualquer tipo de variação, ou seja, a razão τ_0/τ foi sempre igual a 1, independentemente da concentração de acrilamida em solução e nos três ensaios. Sendo a acrilamida um agente de extinção dinâmico, este resultado sugere que simplesmente não há contacto entre a acrilamida e os metaloantibióticos, sendo este um pré-requisito necessário para a ocorrência de extinção de fluorescência dinâmica. (109) A invisibilidade dos metaloantibióticos à acrilamida pode dever-se a uma incompatibilidade estrutural entre eles, não fazendo sentido prosseguir com as experiências na presença de lípido com este agente de extinção.

2.2 Anisotropia de Fluorescência por Fluorescência em Modo Estacionário

De modo a complementar a informação obtida pelos dados de extinção de fluorescência pelo ião iodeto, foram realizados estudos de anisotropia de fluorescência em modo estacionário com as sondas TMA-DPH e DPH. Esta técnica além de permitir estudar a localização das moléculas de metaloantibióticos em LUVs de extrato total de *E.coli*, permitiu ainda avaliar a influência da sua incorporação na fluidez da membrana. (17,129)

A anisotropia de fluorescência em modo estacionário monitoriza mudanças nas restrições rotacionais das sondas, impostas pela ordem e desordem das cadeias alifáticas, após a passagem da fase gel para a fase fluida com o aumento de temperatura.

O TMA-DPH e o DPH foram as sondas fluorescentes escolhidas, dadas as suas características biofísicas bem conhecidas. O DPH está totalmente embebido na membrana, dada a sua natureza hidrofóbica e incorpora-se bem entre as cadeias alquila dos ácidos gordos, enquanto o TMA-DPH, devido ao seu grupo catiónico ancorado ao anel fenilo da porção DPH, encontra-se parcialmente embebido na interface água/membrana. (17,41,129) A utilização das sondas fluorescentes DPH e TMA-DPH permite avaliar a interação do metaloantibiótico com a membrana na região hidrofóbica e na interface aquosa da membrana, respetivamente.

Para evitar a competição entre as moléculas de fármaco e de sonda na ocupação do núcleo hidrofóbico das vesículas lipossômicas, foi usada uma razão molar de sonda:lípido de 1:300. Assim sendo, o comportamento observado deve-se unicamente a alterações na estrutura lipídica. (17,41) A variação da anisotropia de fluorescência, em função da temperatura (de ~ 10 a 80 °C), das sondas DPH e TMA-DPH incorporadas em lipossomas de extrato total de *E. coli* na ausência e na presença de metaloantibióticos encontra-se representada na Figura 32. A anisotropia de fluorescência (r) é definida pela equação 7. A fluorescência dos metaloantibióticos a qualquer um dos comprimentos de onda usados nesta experiência é desprezável. (17)

Novas Estratégias para Entender o Sistema de Influxo de Antibióticos e a Resistência Antimicrobiana a Nível Molecular

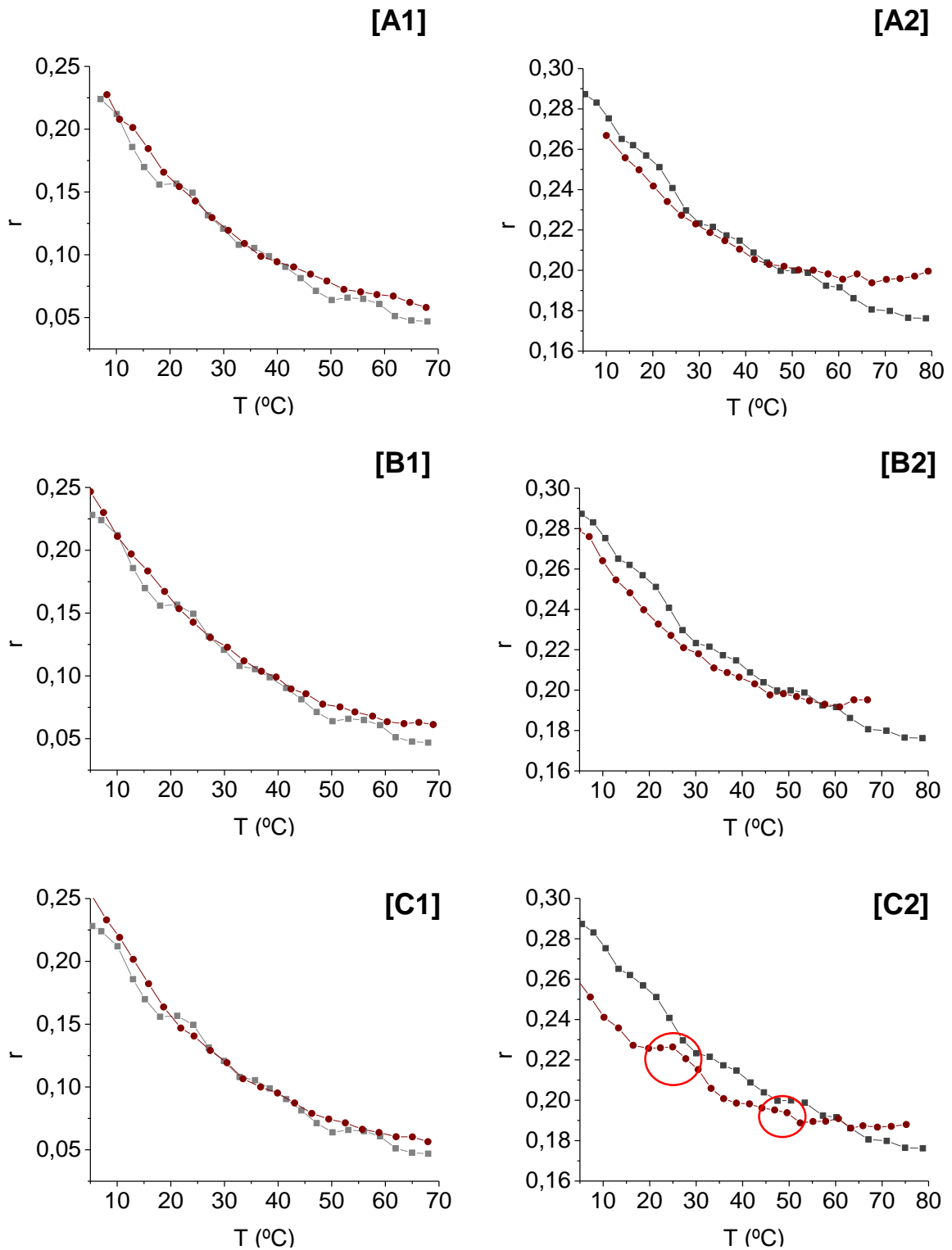


Figura 32. Variação da anisotropia de fluorescência, em função da temperatura, do DPH (grupo 1) e TMA-DPH (grupo 2) em lipossomas de extrato total de *E. coli* na ausência (quadrados cinzentos) e na presença de metaloantibiótico (círculos castanhos): [A] – [Cu(II)/cpx/phen], [B] – [Cu(II)/lvx/phen] e [C] – [Cu(II)/mxfx/phen].

Experiências anteriores de anisotropia realizadas por incorporação das sondas DPH e TMA-DPH em sistemas modelo compostos por extrato total de *E. coli*, reportaram a existência de quatro temperaturas de transição de fase para este sistema, como se pode observar na Figura 32 (quadrados cinzentos). (41) Como anteriormente referido, a membrana externa de *E. coli* é composta por uma mistura de diferentes ambientes lipídicos que contribuem de forma distinta para as propriedades termotrópicas da membrana. As duas primeiras transições são atribuídas à presença de misturas de vários tipos de lípidos de PE e PG. Por outro lado, as transições a temperaturas superiores devem estar relacionadas com a interação entre as moléculas de PE e CL e ainda com as diferentes estruturas de CL (dependendo da estrutura das suas cadeias hidrocarbonadas a T_m pode variar entre 35 – 62 °C). (41)

As temperaturas de transição reportadas por Lopes *et al.* (41) estão sumariadas na Tabela 8. Neste tipo de ensaios, onde as sondas estão especificamente localizadas numa fase, as transições são observadas por uma mudança brusca no sinal de anisotropia. À medida que a temperatura varia, as sondas são uniformemente distribuídas ao longo de todas as fases do sistema. (41) Visto que as duas sondas estão localizadas em zonas distintas da bicamada e as temperaturas de transição reportadas por ambas estão dentro do mesmo intervalo, tal significa que o comportamento termotrópico deste sistema lipídico está caracterizado. (41)

Tabela 8. Temperaturas de transição (T_m /°C) reportadas para o sistema de Extrato total de *E. coli* (em tampão HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 0,1M), usando DPH e TMA-DPH por anisotropia de fluorescência por espectroscopia de fluorescência em modo estacionário. (41)

<i>E. coli</i> total	T_{m1}	T_{m2}	T_{m3}	T_{m4}
DPH	13,4 ± 0,6	28,5 ± 0,7	42,1 ± 1,2	62,5 ± 1,4
TMA-DPH	11,1 ± 1,6	25,0 ± 1,0	43,2 ± 1,9	63,0 ± 0,8

Através da Figura 32, verifica-se que na presença dos metaloantibióticos o perfil de anisotropia para as duas sondas altera-se (círculos castanhos). Esta mudança de anisotropia traduz restrições sentidas pelas sondas no seu microambiente.

Nos ensaios realizados com a sonda DPH (grupo 1), o perfil obtido com os três metaloantibióticos é bastante semelhante. Os valores de anisotropia variaram ligeiramente mas verificou-se a perda das quatro temperaturas de transição de fase características dos lipossomas de *E. coli* total. Este comportamento da sonda sugere uma ordenação estrutural da bicamada fosfolipídica, menos suscetível a variações de temperatura, que apenas pode ser resultante da inserção do metaloantibiótico na bicamada. (132) Depois de penetrarem

na membrana, as moléculas de metaloantibióticos devido ao seu volume considerável, conseqüentemente dificultam o movimento da sonda fluorescente. (133) Como o DPH está profundamente embebido (7,8 Å a partir do centro da bicamada) (102), o comportamento refletido nas experiências com esta sonda permite concluir que os metaloantibióticos estão localizados no núcleo hidrofóbico da membrana.

Por outro lado, nas experiências realizadas com a sonda TMA-DPH (grupo 2), o perfil anisotrópico obtido para os três metaloantibióticos não é tão linear relativamente ao obtido com o DPH. De uma forma geral, verifica-se que nos três casos há uma diminuição no valor de anisotropia abaixo da terceira temperatura de transição (~ 40 °C), o que sugere um aumento de fluidez na região da interface dos lipossomas de *E. coli*. Este comportamento membranar pode ser explicado pela neutralização das cargas negativas presentes à superfície dos lipossomas, pelas espécies catiónicas de metaloantibióticos presentes a pH fisiológico. Com o aumento da temperatura, o número de cargas negativas expostas aumenta (devido ao aumento do movimento térmico dos fosfolípidos) e, conseqüentemente, mais moléculas de metaloantibiótico interagem com a membrana. Este fenómeno provoca uma diminuição da polarização generalizada da membrana. (133) Esta interação eletrostática já foi mencionada em vários estudos sobre a interação de antibióticos com bicamadas lipídicas. (134-136)

Para os complexos da Ciprofloxacina [A2] e da Levofloxacina [B2] verificou-se ainda a perda de todas as temperaturas de transição na anisotropia do TMA-DPH. Possivelmente, como resultado das interações eletrostáticas, ocorre uma estabilização da estrutura membranar fazendo com que se torne menos sensível ao aumento de temperatura. Isto pode ser explicado tendo em conta que em membranas com uma composição química complexa, as transições de fase nos estudos anisotrópicos não descreverem um sinal de forma tão perceptível. Este facto é também reportado em membranas de qualquer célula viva. (133)

Contrariamente, na presença do complexo da Moxifloxacina [C2] não ocorre perda das transições de fase dos lípidos na experiência reportada com o TMA-DPH. Apesar dos três metaloantibióticos possuírem uma seletividade para os lípidos aniónicos da membrana (dada as cargas positivas a pH fisiológico) e ser espectável que interagissem de igual modo com estes grupos negativos, isso não parece acontecer no caso do metaloantibiótico da Moxifloxacina. Este facto poderá estar relacionado com a presença de domínios membranares, ou seja, regiões com uma composição diferente. Há evidências de que a membrana externa de *E. coli* possui domínios ricos em PE, PG e CL. (43) Este resultado parece indicar que o complexo da Moxifloxacina interage com um tipo de domínio em

particular e, por isso, as transições de fase dos lípidos são mantidas. Contudo, as temperaturas de transição dos lipossomas de extrato total de *E. coli* experienciadas pela sonda TMA-DPH sofreram alterações. A variação das temperaturas de transição dos lípidos na presença do metaloantibiótico da Moxifloxacina ([C2]), assinaladas a vermelho, apresentam-se na Tabela 9. A equação 7 foi usada no ajuste dos dados de anisotropia *versus* temperatura.

Tabela 9. Valores da temperatura de transição de fase (T_m) de lipossomas de extrato total de *E. coli* com TMA-DPH incorporada obtidos através do ajuste não-linear dos dados de anisotropia de fluorescência estática da Figura 32 – [C2].

	T_{m1} (°C)	T_{m2} (°C)	T_{m3} (°C)	T_{m4} (°C)
Extrato total				
<i>E. coli</i>	$11,1 \pm 1,6$ ⁽⁴¹⁾	$25,0 \pm 1,0$ ⁽⁴¹⁾	$43,2 \pm 1,9$ ⁽⁴¹⁾	$63,0 \pm 0,8$ ⁽⁴¹⁾
[Cu(II)/mxfx/phen]	-	$30,5 \pm 0,3$	$47,9 \pm 0,7$	-

Analisando a Tabela 9, verifica-se que a temperatura de transição de fase do lípido na presença do complexo CuMxfxPhen mostra um aumento de ~ 5 °C para a T_{m2} e T_{m3} . Devido ao elevado erro associado na determinação das temperaturas T_{m1} e T_{m4} , estas não foram incluídas. O aumento das temperaturas de transição é indicativo de uma maior ordenação estrutural na fase fluída. (132) Estes resultados sugerem que o metaloantibiótico da Moxifloxacina deve estar localizado muito próximo da interface água/membrana. Além disso, este resultado é corroborado pelos dados obtidos pela extinção de fluorescência pelo ião iodeto, onde este complexo se mostra constantemente acessível a este agente de extinção.

Desta forma, os resultados obtidos pelas experiências de anisotropia de fluorescência com o DPH e TMA-DPH sugerem que os metaloantibióticos são atraídos para os grupos carregados negativamente dos lípidos. Como consequência, esta interação electrostática permite a inserção do metaloantibiótico no interior da bicamada. É possível que a acumulação de antibiótico forme domínios entre os fosfolípidos e possibilite a permeação do metaloantibiótico através da membrana.

Os estudos de localização por extinção e anisotropia de fluorescência em LUVs de *E. coli* total encontrados na literatura para várias FQs na forma livre, incluindo a Ciprofloxacina e Moxifloxacina (17,102,129,137), reportam que as FQs devem estar localizadas perto das cabeças fosfolipídicas mas não penetram profundamente a bicamada. As experiências de extinção de fluorescência pelo ião iodeto são concordantes com os dados de anisotropia reportados pelo TMA-DPH e sugerem que as FQs interagem electrostaticamente com os

grupos negativos dos lípidos da membrana. Os dados com a sonda DPH não apresentam variações significativas, o que confirma a localização das FQs livres apenas na interface água/lípido.

2.3 Conclusões

A realização dos estudos de extinção de fluorescência pelo ião iodeto e de anisotropia de fluorescência pelas sondas DPH e TMA-DPH permitiu obter informação sobre a localização e inserção dos metaloantibióticos nos LUVs de *E. coli* total.

A partir das experiências de extinção de fluorescência com o ião iodeto foi obtida informação acerca da profundidade relativa dos metaloantibióticos na bicamada, uma vez que este agente de extinção apenas tem acesso à parte mais superficial da membrana. Na presença de lipossomas, os metaloantibióticos da Ciprofloxacina e Levofloxacina tornam-se menos acessíveis ao iodeto. Este resultado sugere que ambos os complexos estão localizados no núcleo hidrofóbico da bicamada, numa zona que o ião iodeto não consegue atingir. Por outro lado, a acessibilidade praticamente constante do metaloantibiótico da Moxifloxacina ao iodeto sugere a sua localização numa região mais próxima da interface água/lípido.

Os estudos de anisotropia complementam e confirmam os resultados obtidos por extinção de fluorescência. Os dados obtidos com a sonda TMA-DPH (localizada a 10,9 Å a partir do centro da bicamada) sugerem a ocorrência de interações eletrostáticas entre as espécies catiónicas dos metaloantibióticos com os grupos aniónicos dos fosfolípidos da membrana. Contudo, o resultado obtido para o metaloantibiótico da Moxifloxacina sugere que provavelmente este antibiótico tem preferência por domínios específicos da membrana e, por essa razão, é mais visível na interface água/lípido. De qualquer modo, os dados obtidos com a sonda DPH (localizada a 7,8 Å a partir do centro da bicamada) mostram a inserção dos três metaloantibióticos na membrana.

Tendo em conta os resultados obtidos pelos estudos de localização, é possível concluir que os metaloantibióticos das três FQs estudadas permeiam diretamente para o interior da bicamada lipídica. O mecanismo envolvido na sua entrada na célula bacteriana parece

incluir primeiramente uma adsorção eletrostática forte à região da interface, o que potencia a entrada do metaloantibiótico pela via hidrofóbica.

Como conclusão, os dados obtidos neste trabalho indicam que os metaloantibióticos podem ser candidatos adequados para mais testes avançados a fim de substituir as respectivas FQs puras. A limitação da permeabilidade celular causada pela baixa expressão ou alteração da porina necessária para a entrada de FQs na célula, é um dos principais mecanismos de resistência bacteriana a FQs que parece ser ultrapassado com os metaloantibióticos.

IV. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com este capítulo pretende-se reforçar as principais conclusões obtidas com a realização deste trabalho, com o objetivo de compreender o papel dos lípidos no transporte de metaloantibióticos em estirpes bacterianas. A utilização de metaloantibióticos, como novos derivados das FQs, tem sido apontada como uma alternativa para combater um dos principais mecanismos de resistência bacteriana a antibióticos – mutações em porinas. (1,4-6) Neste trabalho foi determinada a interação e localização dos metaloantibióticos da Ciprofloxacina, Levofloxacina e Moxifloxacina, FQs de 2^a, 3^a e 4^a geração respectivamente, com um sistema modelo mimético da membrana externa de bactérias Gram-negativas.

1.1 Considerações Finais

O *design* de novos fármacos é uma estratégia válida e importante para combater a resistência bacteriana a antibióticos. Devido ao conhecimento dos mecanismos de resistência, o desenvolvimento de antibióticos que atacam diretamente as membranas bacterianas parece ser uma via promissora. (1,5) Estudos biológicos recentes com FQs e íons de metais de transição mostram claramente que o íon cobre(II) pode formar complexos ternários muito estáveis com FQs e fenantrolina, e ainda que esses complexos são agentes antimicrobianos (metaloantibióticos) tão ou mais eficientes que o respectivo antibiótico na forma livre. (4,7,22) Além disso, os estudos biofísicos sugerem que o mecanismo de entrada na célula bacteriana destes complexos parece ter uma base diferente relativamente à FQ na forma livre. (1,4-7,22)

Tendo em conta que (1) – o ataque direto das membranas bacterianas é pensado para ser uma maneira de contornar os mecanismos de resistência de bactérias e que (2) – os metaloantibióticos são fármacos promissores por poderem exercer uma atividade antimicrobiana potenciada, neste trabalho os estudos realizados focaram-se no mecanismo de entrada dos complexos metálicos da Ciprofloxacina, Levofloxacina e Moxifloxacina, FQs de 2^a, 3^a e 4^a geração respetivamente, com um sistema modelo da membrana externa de *Escherichia coli*. O mecanismo de entrada dos metaloantibióticos foi estudado através da sua partição e localização em lipossomas de extrato total de *E. coli*, de forma a mimetizar a química e o ambiente anisotrópico estrutural da membrana externa desta bactéria Gram-negativa. Porém, os lipossomas preparados foram privados da maquinaria de transporte, porinas, reportada como necessária para as FQs alcançarem o seu alvo. (2,3,5)

A análise quantitativa da partição ($\log K_p$), corroborando com estudos biofísicos precedentes, confirmou que os complexos metálicos CuCpxPhen (5), CuLvxPhen (resultados não publicados) e CuMxfxPhen (1) têm uma interação significativamente mais elevada com os lipossomas de *E. coli* do que o respectivo antibiótico na forma livre. Visto que as espécies de complexo de FQs que existem a pH fisiológico, CuHLA e CuH₂LA, são catiónicas este resultado sugere que estas prontamente promovem interações eletrostáticas específicas com os grupos aniónicos característicos de moléculas de PG e CL presentes no sistema membranas de *E. coli*. As propriedades físico-químicas dos metaloantibióticos aumentam consideravelmente sua afinidade com os lipossomas e, conseqüentemente modificam/melhoram o mecanismo de entrada destes antibióticos na célula bacteriana.

Os resultados obtidos para os coeficientes de partição são corroborados pelos obtidos nos estudos de localização membranar e sugerem claramente a internalização dos metaloantibióticos das FQs na bicamada lipídica. A localização membranar dos metaloantibióticos foi determinada pela combinação de extinção de fluorescência e anisotropia de fluorescência, de modo a obter um resultado mais elucidativo, dada a complexidade do sistema membranar de extrato total de *E. coli*.

Os dados da extinção de fluorescência pelo ião iodeto, um agente de extinção solúvel em água, revelaram a existência de população inacessível dos complexos CuCpxPhen e CuLvxPhen na presença de vesículas lipídicas. Este resultado sugere que estes dois metaloantibióticos se localizam numa zona inalcançável pelo iodeto, como o núcleo hidrofóbico ou o espaço interno aquoso do lipossoma. No caso do complexo CuMxfxPhen, quase todos os fluoróforos se mostraram acessíveis ao iodeto na presença de LUVs de *E. coli*, pelo que sugere uma localização mais próxima da interface água/membrana. A localização dos metaloantibióticos na membrana lipídica foi complementada pelos estudos de anisotropia de fluorescência, através da avaliação do perfil anisotrópico das sondas DPH e TMA-DPH na membrana de *E. coli* total.

Os resultados obtidos com as experiências de anisotropia de fluorescência mostraram-se concordantes com os resultados obtidos com a extinção de fluorescência pelo ião iodeto. A localização do complexo CuMxfxPhen na região da interface foi suportada pela alteração notória no perfil da sonda TMA-DPH. Este perfil foi ainda acompanhado por um aumento das temperaturas de transição de fase dos lípidos, que indicou uma maior ordenação estrutural na fase fluída. O comportamento distinto verificado no complexo da Moxifloxacina relativamente ao complexo da Ciprofloxacina e Levofloxacina sugere que, o metaloantibiótico da Moxifloxacina, interage com um tipo de domínio lipídico particular e não de uma forma genérica como parece verificar-se nos outros dois metaloantibióticos. Por outro lado, nos estudos anisotrópicos com o DPH verificou-se que a anisotropia desta sonda foi afetada de igual forma na presença dos três metaloantibióticos, refletindo a perda das fases de transição dos lípidos. Uma vez que a anisotropia em modo estacionário monitoriza mudanças nas restrições rotacionais das sondas fluorescentes e o DPH é a sonda hidrofóbica localizada a 7,5 Å do centro da bicamada, este comportamento indica que na presença de cada metaloantibiótico há uma ordenação estrutural da bicamada fosfolipídica que apenas pode ser causada pela inserção do antibiótico nesta zona.

Considerando estes resultados é possível considerar que os metaloantibióticos estudados têm um mecanismo de entrada diferente comparativamente à FQ livre, fortemente dependente das interações fármaco-lípido. Esta forte associação entre as espécies

carregadas positivamente dos metaloantibióticos, as quais existem a pH fisiológico, com os grupos carregados negativamente dos lípidos potencia o influxo destes antibióticos baseado na via hidrofóbica. Por outro lado, os antibióticos na forma livre requerem a interface lípido/porina ou a porina para serem internalizados. (2,3,35,36)

Em suma, a maior barreira permeável de bactérias Gram-negativas para a entrada de FQs é a membrana externa. A redução da permeabilidade desta membrana, devido à baixa expressão/mutações em porinas, constitui um dos principais mecanismos de resistência bacteriana. Devido a este conhecimento, os metaloantibióticos são uma via promissora visto que a sua entrada na célula é governada primeiramente pela via autopromovida (compostos catiónicos). Os resultados obtidos com a realização deste trabalho tornam-se ainda mais prometedores, uma vez que o sistema membranar utilizado se aproxima o máximo possível das membranas bacterianas naturais de *E. coli*.

1.2 Perspetivas Futuras

Os estudos biofísicos realizados sugerem que a via de entrada dos metaloantibióticos parece ser diferente das respetivas FQs e, por isso, os complexos parecem ser candidatos adequados para mais testes biológicos em microrganismos que exibem um fenótipo de resistência a FQs. Neste contexto, também os estudos realizados em solução são fundamentais para perceber o comportamento dos metaloantibióticos, pois apesar das suas limitações, são a melhor representação de uma situação *in vivo*. Não há muitas equipas de investigação que tenham o seu esforço focado nesta área e por isso, muito do trabalho publicado relaciona a atividade biológica dos metaloantibióticos com as suas propriedades no estado sólido, conduzindo a extrapolações e, em muitos casos, a conclusões erradas.

O desenvolvimento de novos fármacos tem estagnado nos últimos anos, com poucos novos agentes antimicrobianos a entrarem em ensaios com seres humanos e ainda menos a serem aprovados para uso terapêutico. Particularmente, nenhuma nova classe de antibióticos para tratar bacilos Gram-negativos foi proposta há mais de 40 anos (desde a introdução das FQs). O descobrimento e desenvolvimento de antibióticos tem-se tornado

cientificamente mais complexo, mais caro e muito mais demorado. Além disso, todas as burocracias impostas para a aprovação de um antibiótico através da *U.S. FDA* e *European Medicines Agency* têm dificultado cada vez mais este processo durante a última década.

(4) Os resultados supracitados sugerem o potencial dos metaloantibióticos como substitutos das FQs propondo o uso de novas formulações, e não necessariamente novos compostos, o que poderia ser um meio de introduzir terapias mais rápidas com períodos de teste reduzidos e menor exigência a nível regulamentar.

V. REFERÊNCIAS

1. Lopes SC, Ribeiro C, Gameiro P. A New Approach to Counteract Bacteria Resistance: A Comparative Study Between Moxifloxacin and a New Moxifloxacin Derivative in Different Model Systems of Bacterial Membrane. *Chem Biol Drug Des.* 2013; 81:265–274.
2. Neves P, Berkane E, Gameiro P, Winterhalter M, de Castro B. Interaction between quinolones antibiotics and bacterial outer membrane porin OmpF. *Biophysical Chemistry.* 2005; 113:123–128.
3. Mach T, Neves P, Spiga E, Weingart H, Winterhalter M, Ruggerone P, et al. Facilitated Permeation of Antibiotics across Membrane Channels - Interaction of the Quinolone Moxifloxacin with the OmpF Channel. *Journal of the American Chemical Society.* 2008; 130:13301–13309.
4. Feio MJ, Sousa I, Ferreira M, Cunha-Silva L, Saraiva RG, Queirós C, et al. Fluoroquinolone–metal complexes: A route to counteract bacterial resistance? *Journal of Inorganic Biochemistry.* 2014; 138:129–143.
5. Ferreira M, Gameiro P. Ciprofloxacin Metalloantibiotic: An Effective Antibiotic with an Influx Route Strongly Dependent on Lipid Interaction?. *J Membrane Biol.* 2015; 248:125–136.
6. Ribeiro C, Lopes SC, Gameiro P. New Insights into the Translocation Route of Enrofloxacin and Its Metalloantibiotics. *J Membrane Biol.* 2011; 241:117–125.
7. Sousa I, Claro V, Pereira JL, Amaral AL, Cunha-Silva L, de Castro B, et al. Synthesis, characterization and antibacterial studies of a copper(II) levofloxacin ternary complex. *Journal of Inorganic Biochemistry.* 2012; 110:64–71.
8. Fernandes P, Sousa I, Cunha-Silva L, Ferreira M, de Castro B, Pereira EF, et al. Synthesis, characterization and antibacterial studies of a copper(II) lomefloxacin ternary complex. *Journal of Inorganic Biochemistry.* 2014; 131:21–29.
9. Ruiz, J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2003; 51:1109–1117.
10. Patel MN, Patel CR, Joshi H. Metal-Based Biologically Active Compounds: Synthesis, Characterization, DNA Interaction, Antibacterial, Cytotoxic and SOD Mimic Activities. *Appl Biochem Biotechnol.* 2013; 169:1329–1345.
11. Turel I. The interactions of metal ions with quinolone antibacterial agents. *Coordination Chemistry Reviews.* 2002; 232:27–47.
12. Owens Jr RC, Ambrose PG. Clinical use of the fluoroquinolones. *Medical Clinics of North America.* 2000; 84(6):1447–1469.
13. Leshner GY, Froelich EJ, Gruett MD, et al. 1,8-Naphthyridine Derivates. A new class of chemotherapeutic agents. *J Med Pharm Chem.* 1962; 5(5):1063–1065.
14. King DE, Malone R, Lilley SH. New classification and update on the quinolone antibiotics. *Am. Fam. Phys.* 2000; 61(9):2741–1748.

Novas Estratégias para Entender o Sistema de Influxo de Antibióticos e a Resistência Antimicrobiana a Nível Molecular

15. Kłosińska-Szumrło E, Pluciński FA, Grudzień M, et al. Experimental and theoretical studies on the molecular properties of ciprofloxacin, norfloxacin, pefloxacin, sparfloxacin, and gatifloxacin in determining bioavailability. *J Biol Phys*. 2014; 40:335–345.
16. Scholar EM. Fluoroquinolones: Past, Present and Future of a Novel Group of Antibacterial Agents. *Am. J. Pharm. Educ*. 2003; 66:164–172.
17. Neves P, Leite A, Rangel M, de Castro B, Gameiro P. Influence of structural factors on the enhanced activity of moxifloxacin: a fluorescence and EPR spectroscopic study. *Anal Bioanal Chem*. 2007; 387:1543–1552.
18. Andriole VT. *The Quinolones*. 3 ed. San Diego: Academic Press; 2000.
19. Sanz-Nebot V, Valls I, Barbero D, Barbosa J. Acid-Base Behavior of Quinolones in Aqueous Acetonitrile Mixtures. *Acta Chemica Scandinavica*. 1997; 51:896–903.
20. Turel I, Bukovec N. Complex formation between some metals and a quinolone family member (ciprofloxacin). *Polyhedron*. 1996; 15(2):269–275.
21. Gameiro P, Rodrigues C, Baptista T, Sousa I, de Castro B. Solution studies on binary and ternary complexes of copper(II) with some fluoroquinolones and 1,10-phenanthroline: Antimicrobial activity of ternary metalloantibiotics. *International Journal of Pharmaceutics*. 2007; 334:129–136.
22. Saraiva R, Lopes S, Ferreira M, Novais F, Pereira E, Feio MJ, Gameiro P. Solution and biological behaviour of enrofloxacin metalloantibiotics: A route to counteract bacterial resistance?. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2010; 104(8):843–850.
23. Kawai Y, Matsubayashi K, Hakusui H. Interaction of quinolones with metal cations in aqueous solution. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1996; 44(8):1425–1430.
24. Ross DL, Riley CM. Dissociation and complexation of the fluoroquinolone antimicrobials — an update. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1994; 12(10):1325–1331.
25. Efthimiadou EK, Katsarou ME, Karaliota A, Psomas G. Copper(II) complexes with sparfloxacin and nitrogen-donor heterocyclic ligands: Structure–activity relationship. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2008; 102(4):910–920.
26. Drlica K, Malik M, Kerns RJ, Zhao X. Quinolone-Mediated Bacterial Death. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2008; 52(2):385–392.
27. Drlica K, Zhao X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1997; 61(3):377–92.
28. Webber MA, Ricci V, Whitehead R, Patel M, Fookes M, Ivens A, Piddock LJV. Clinically relevant mutant DNA gyrase alters supercoiling, changes the transcriptome, and confers multidrug resistance. *mBio*. 2013; 4(4):273–313.
29. Skauge T, Turel I, Sletten E. Interaction between ciprofloxacin and DNA mediated by Mg²⁺- ions. *Inorganica Chimica Acta*. 2002; 339:239–247.
30. Mitscher L. Bacterial Topoisomerase Inhibitors: Quinolone and Pyridone Antibacterial Agents. *Chem. Rev*. 2005; 105(2):559–592.
31. Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJV. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends in Microbiology*. 2014; 22(8):432–445.
32. Pagès JM, James CE, Winterhalter M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews*. 2008; 6:893–903.

33. Davin-Regli A, Bolla JM, James CE, Lavigne JP, Chevalier J, Garnotel E, et al. Membrane permeability and regulation of drug “influx and efflux” in enterobacterial pathogens. *Current Drug Targets*. 2008; 9(9):750–759.
34. Livermore DM, Hope R, Reynolds R, Blackburn R, Johnson AP, Woodford N. Declining cephalosporin and fluoroquinolone non-susceptibility among bloodstream Enterobacteriaceae from the UK: links to prescribing change? *J. Antimicrob. Chemother.* 2013; 68(11):2667–2674.
35. O’Keeffe AH, East JM, Lee AG. Selectivity in Lipid Binding to the Bacterial Outer Membrane Protein OmpF. *Biophysical Journal*. 2000; 79(4):2066–2074.
36. Neves P, Sousa I, Winterhalter M, Gameiro P. Fluorescence Quenching as a Tool to Investigate Quinolone Antibiotic Interactions with Bacterial Protein OmpF. *J Membrane Biol*. 2009; 227:133–140.
37. Serafin A, Stanczak A. The complexes of metal ions with fluoroquinolones. *Russ. J. Coord. Chem.* 2009; 35(2):81–95.
38. Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clarck DP. *Brock – Biology Of Microorganisms*. 12 ed. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings; 2009.
39. Quintas A, Freire A, Halpern M. *Bioquímica – Organização Molecular da Vida*. 1 ed. Lisboa: Lidel; 2008.
40. Willey JM, Sherwood L, Woolverton CJ. *Prescott, Harley, and Klein's Microbiology*. New York: McGraw-Hill Higher Education; 2008.
41. Lopes S, Neves CS, Eaton P, Gameiro P. Cardiolipin, a key component to mimic the E. coli bacterial membrane in model systems revealed by dynamic light scattering and steady-state fluorescence anisotropy. *Anal Bioanal Chem*. 2010; 398:1357–1366.
42. Cooper GM, Hausman RE. *The Cell – A Molecular Approach*. 5 ed. Washington: ASM Press; 2009.
43. Epand RM, Epand RF. Lipid domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agentes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009; 1788:289–294.
44. Lolis E, Bucala R. Therapeutic approaches to innate immunity: severe sepsis and septic shock. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2003; 2:635–645.
45. Nikaido H. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2003; 67(4):593–656.
46. Koebnik R, Locher KP, Gelder PV. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Molecular Microbiology*. 2000; 37(2):239–253.
47. van Meer G, Voelker D, Feigenson G. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2008; 9(2):112–124.
48. Raetz CRH. Biochemistry of Endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*. 1990; 59(1):129–170.
49. Nikaido H. Porins and Specific Diffusion Channels in Bacterial Outer Membranes. *The Journal of Biological Chemistry*. 1994; 269(6):3905–3908.
50. Saint N, Lou KL, Widmer C, Luckey M, Schirmer T, Rosenbusch JP. Structural and functional characterization of OmpF porin mutants selected for larger pore size, II. Functional characterization. *The Journal of Biological Chemistry*. 1996; 271(34): 20676–80.
51. Lou KL, Saint N, Prillipov A, Rummel G, Benson SA, Rosenbusch JP, Schirmer T. Structural and functional characterization of OmpF porin mutants selected for larger pore size, I. Crystallographic analysis. *The Journal of Biological Chemistry*. 1996; 271(34): 20669–75.

Novas Estratégias para Entender o Sistema de Influxo de Antibióticos e a Resistência Antimicrobiana a Nível Molecular

52. Mortimer PG, Piddock LJ. The accumulation of five antibacterial agents in porin-deficient mutants of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 1993; 32(2):195–213.
53. Berlanga M, Ruiz N, Hernandez-Borrell, Montero T, Viñas M. Role of the outer membrane in the accumulation of quinolones by *Serratia marcescens*. *Can. J. Microbiol.* 2000; 46(8):716–722.
54. Begic S, Worobec EA. Site-directed mutagenesis studies to probe the role of specific residues in the external loop (L3) of OmpF and OmpC porins in susceptibility of *Serratia marcescens* to antibiotics. *Can. J. Microbiol.* 2007; 53(6):710–719.
55. Webber M, Piddock LJV. Quinolone resistance in *Escherichia coli*. *Vet. Res.* 2001; 32(3-4):275–284.
56. Danelon C, Nestorovich EM, Winterhalter M, Ceccarelli M, Bezrukov SM. Interaction of zwitterionic penicillins with the OmpF channel facilitates their translocation. *Biophys. J.* 2006; 90(5):1617–1627.
57. Epanand RM, Epanand RF. Bacterial membrane lipids in the action of antimicrobial agents. *Journal of Peptide Science.* 2011. 17(5):298–305.
58. Arouri A, Dathe M, Blume A. Peptide induced demixing in PG/PE lipid mixtures: a mechanism for the specificity of antimicrobial peptides towards bacterial membranes? *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1788(3):650–659.
59. Epanand R, Maloy L, Ramamoorthy A, Epanand R. Amphipathic helical cationic antimicrobial peptides promote rapid formation of crystalline states in the presence of phosphatidylglycerol: lipid clustering in anionic membranes. *Biophys J.* 2010; 98(11):2564–73.
60. Epanand R, Wang G, Berno B, Epanand R. Lipid segregation explains selective toxicity of a series of fragments derived from the human cathelicidin LL-37. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(9):3705–14.
61. Haney EF, Nathoo S, Vogel H, Prenner EJ. Induction of non-lamellar lipid phases by antimicrobial peptides: a potential link to mode of action. *Chem Phys Lipids.* 2010; 163(1):82–93.
62. Porkony A, Almeida PF. Permeabilization of raft-containing lipid vesicles by δ -lysine: a mechanism for cell sensitivity to cytotoxic peptides. *Biochemistry.* 2005; 44(27):9538–9544.
63. Pokorny A, Birkbeck T, Almeida P. Mechanism and kinetics of δ -lysine interaction with phospholipid vesicles. *Biochemistry.* 2002; 41(36):11044–56.
64. Epanand RF, Schmitt MA, Gellman SH, Epanand RM. Role of membrane lipids in the mechanism of bacterial species selective toxicity by two α/β -antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006; 1758(9):1343–50.
65. Epanand RF, Mowery BP, Lee SE, Stahl SS, Lehrer RI, Gellman SH, Epanand RM. Dual mechanism of bacterial lethality for a cationic sequence-random copolymer that mimics host-defense antimicrobial peptides. *J. Mol. Biol.* 2008; 379(1):38–50.
66. Jean-François F, Castano S, Desbat B, Odaert B, Roux M, Metz-Boutigue MH, Dufourc EJ. Aggregation of cateslytin β -sheets on negatively charged lipids promotes rigid membrane domains. A new mode of action for antimicrobial peptides. *Biochemistry.* 2008; 47(24):6394–6402.
67. Patel MN, Parmar PA, Gandhi DS. Square pyramidal copper(II) complexes with fourth generation fluoroquinolone and neutral bidentate ligand: Structure, antibacterial, SOD mimic and DNA-interaction studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2010; 18:1227–1235.
68. Drevensek P, Kosmrlj J, Giester G, Skauge T, Sletten E, Sepčić K, Turel I. X-Ray crystallographic, NMR and antimicrobial activity studies of magnesium complexes of

- fluoroquinolones – racemic ofloxacin and its S-form, levofloxacin. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2006; 100(11):1755–1763.
69. Efthimiadou E, Karaliota A, Psomas G. Mononuclear metal complexes of the second-generation quinolone antibacterial agent enrofloxacin: Synthesis, structure, antibacterial activity and interaction with DNA. *Polyhedron*. 2008; 27(6):1729–1738.
70. Efthimiadou E, Karaliota A, Psomas G. Structure, antimicrobial activity and DNA-binding properties of the cobalt(II)–sparfloxacin complex. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2008; 18(14):4033–4037.
71. Efthimiadou E, Karaliota A, Psomas G. Metal complexes of the third-generation quinolone antimicrobial drug sparfloxacin: Structure and biological evaluation. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2010; 104(4):455–466.
72. El-Halim HFA, Mohamed GG, El-Dessouky MMI, Mahmoud WH. Ligational behaviour of lomefloxacin drug towards Cr(III), Mn(II), Fe(III), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Th(IV) and UO₂(VI) ions: Synthesis, structural characterization and biological activity studies. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2011; 82(1):8–19.
73. Jiménez-Garrido N, Perelló L, Ortiz R, Alzuet G, González-Alvarez M, Cantón E, et al. Antibacterial studies, DNA oxidative cleavage, and crystal structures of Cu(II) and Co(II) complexes with two quinolone family members, ciprofloxacin and enoxacin. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2005; 99(3):677–689.
74. López-Gresa MP, Ortiz R, Perrelló L, Latorre J, Liu-González M, García-Granda S, et al. Interactions of metal ions with two quinolone antimicrobial agents (cinoxacin and ciprofloxacin): Spectroscopic and X-ray structural characterization. Antibacterial studies. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2002; 92(1):65–74.
75. Macías B, Villa MV, Rubio I, Castiñeiras A, Borrás J. Complexes of Ni(II) and Cu(II) with ofloxacin: Crystal structure of a new Cu(II) ofloxacin complex. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2001; 84(3-4):163–170.
76. Perez-Guaita D, Boudesocque S, Sayen S, Guillon E. Cu(II) and Zn(II) complexes with a fluoroquinolone antibiotic: Spectroscopic and X-ray absorption characterization. *Polyhedron*. 2011; 30(2):438–443.
77. Ruiz M, Ortiz R, Perelló L, Latorre J, Server-Carrió J. Potentiometric and spectroscopic studies of transition-metal ions complexes with a quinolone derivative (cinoxacin). Crystal structures of new Cu(II) and Ni(II) cinoxacin complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 1997; 65(2):87–96.
78. Sadeek SA. Synthesis, thermogravimetric analysis, infrared, electronic and mass spectra of Mn(II), Co(II) and Fe(III) norfloxacin complexes. *Journal of Molecular Structure*. 2005; 753(1-3):1–12.
79. Sadeek SA, El-Shwiniy WH. Preparation, structure and microbial evaluation of metal complexes of the second generation quinolone antibacterial drug lomefloxacin. *Journal of Molecular Structure*. 2010; 981(1-3):130–138.
80. Turel I, Leban I, Klintschar G, Bukovec N, Zalar S. Synthesis, crystal structure, and characterization of two metal-quinolone compounds. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 1997; 66(2):77–82.
81. Sultana N, Arayne MS, Rizvi SBS, Haroon U, Mesaik MA. Synthesis, spectroscopic, and biological evaluation of some levofloxacin metal complexes. *Medicinal Chemistry Research*. 2013; 22(3):1371–77.

82. Sadeek S, El-Shwiniy WH, El-Attar MS. Synthesis, characterization and antimicrobial investigation of some moxifloxacin metal complexes. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2011; 84(1):99–110.
83. Turel I, Sonc A, Zupancic M, Sepčić K, Turk T. Biological Activity of Some Magnesium(II) Complexes of Quinolones. *Metal-Based Drugs*. 2000; 7(2):101–104.
84. Anacona JR, Toledo C. Synthesis and antibacterial activity of metal complexes of ciprofloxacin. *Transition Metal Chemistry*. 2001; 26(1):228–231.
85. Shakir M, Hanif S, Sherwani MA, Mohammad O, Al-Resayes SI. Pharmacologically significant complexes of Mn(II), Co(II), Ni(II), Cu(II) and Zn(II) of novel Schiff base ligand, (E)-N-(furan-2-yl methylene) quinolin-8-amine: Synthesis, spectral, XRD, SEM, antimicrobial, antioxidant and in vitro cytotoxic studies. *Journal of Molecular Structure*. 2015; 1092:143–159.
86. Bailar JC, Emeleus HJ, Nyholm RS, Trotman-Dickenson AF. *Comprehensive Inorganic Chemistry*. Oxford: Pergamon Press; 1973.
87. Elliott H, Hathaway BJ, Slade RC. *Inorganic, Physical and Theoretical Chemistry*. Journal of The Chemical Society (A). 1966; Part I(0):1–964.
88. Harris CM, Lockyer TN, Waterman H. Properties of Some Copper Complexes : Five-Covalent Copper (II) Complexes containing 1,10-Phenanthroline and 2,2'-Bipyridyl. *Nature*. 1961; 192:424–425.
89. Fernández-Botello A, Holý A, Moreno V, Sigel H. Intramolecular stacking interactions in ternary copper(II) complexes formed by a heteroaromatic amine and 9-[2-(2-phosphonoethoxy)ethyl]adenine, a relative of the antiviral nucleotide analogue 9-[2-(phosphonomethoxy)ethyl]adenine. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2004; 98(12):2114–2124.
90. Luth MS, Kapinos LE, Song B, Lippert B, Sigel H. Extent of intramolecular stacking interactions in the mixed-ligand complexes formed in aqueous solution by copper(II), 2,2'-bipyridine or 1,10-phenanthroline and 2'-deoxyguanosine 5'-monophosphate. *Journal of the Chemical Society - Dalton Transactions*. 1999; 1(3):357–366.
91. Sigel H. Ternary complexes in solution—XIX Relation between ligand basicity and complex stability. A method for the estimation of stability constants. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry*. 1975; 37(2):507–509.
92. Ruíz P, Ortiz R, Perelló L, Alzuet G, González-Alvarez M, Liu-González M, Sanz-Ruiz F. Synthesis, structure, and nuclease properties of several binary and ternary complexes of copper(II) with norfloxacin and 1,10 phenanthroline. *J. Inorg. Biochem.* 2007; 101(5):831–840.
93. Hernández-Gil J, Perelló L, Ortiz R, Alzuet G, González-Álvarez M, Liu-González M. Synthesis, structure and biological properties of several binary and ternary complexes of copper(II) with ciprofloxacin and 1,10 phenanthroline. *Polyhedron*. 2009; 28(1):138–144.
94. Recillas-Mota J, Flores-Alamo M, Moreno-Esparza R, Gracia-Mora J. A copper(II) complex of 1,10-phenanthroline and enrofloxacin. *Acta Crystallographica Section E*. 2007; 63:3030–3031.
95. Drevenšek P, Zupančič T, Pihlar B, Jerala R, Kolitsch U, Plaper A, Turel I. Mixed-valence Cu(II)/Cu(I) complex of quinolone ciprofloxacin isolated by a hydrothermal reaction in the presence of L-histidine: comparison of biological activities of various copper–ciprofloxacin compounds. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2005; 99(2):432–442.
96. Efthimiadou EK, Sanakis Y, Katsarou M, Raptopoulou CP, Karaliota A, Katsaros N, Psomas G. Neutral and cationic mononuclear copper(II) complexes with enrofloxacin: Structure and biological activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2006; 100(8):1378–1388.

97. Efthimiadou EK, Sanakis Y, Raptopoulou CP, Karaliota A, Katsaros N, Psomas G. Crystal structure, spectroscopic, and biological study of the copper(II) complex with third-generation quinolone antibiotic sparfloxacin. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2006; 16(14):3864–3867.
98. Zivec P, Perdih F, Turel I, Giester G, Psomas G. Different types of copper complexes with the quinolone antimicrobial drugs ofloxacin and norfloxacin: Structure, DNA- and albumin-binding. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2012; 117:35–47.
99. Efthimiadou EK, Thomadaki H, Sanakis Y, Raptopoulou CP, Katsaros N, Scorilas A, et al. Structure and biological properties of the copper(II) complex with the quinolone antibacterial drug N-propyl-norfloxacin and 2,20-bipyridine. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2007; 101:64–73.
100. Jaividhya P, Dhivya R, Akbarsha MA, Palaniandavar M. Efficient DNA cleavage mediated by mononuclear mixed ligand copper(II) phenolate complexes: The role of co-ligand planarity on DNA binding and cleavage and anticancer activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2012; 114:94–105.
101. Peetla C, Stine A, Labhasetwar V. Biophysical interactions with model lipid membranes: applications in drug discovery and drug delivery. *Mol Pharm*. 2009; 6(5):1264–1276.
102. Rodrigues C, Gameiro P, Prieto M, de Castro B. Interaction of rifampicin and isoniazid with large unilamellar liposomes: spectroscopic location studies. *Biochim Biophys Acta*. 2003; 1620(1-3):151–9.
103. Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett*. 2013; 8(1):102.
104. Drulis-Kawa Z, Dorotkiewicz-Jach A. Liposomes as delivery systems for antibiotics. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010; 387:187–198.
105. Lodish H, Berck A, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Bretscher A, et al. *Molecular Cell Biology*. 7 ed. USA: W.H. Freeman and Company; 2013.
106. Hope MJ, Bally MB, Webb G, Cullis PR. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1985; 812:55–65.
107. Bangham AD, Standish MM, Weissmann G. The action of steroids and streptolysin S on the permeability of phospholipid structures to cations. *Journal of Molecular Biology*. 1965; 13:253–259.
108. Olson F, Hunt CA, Szoka FC, Vail WJ, Papahadjopoulos D. Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 1979; 557(1):9–23.
109. Lakowicz JR. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3 ed. New York: Springer; 2006.
110. Van Holde KE, Johnson WC, Shing Ho P. *Principles of Physical Biochemistry*. 2 ed. Pearson; 2006.
111. Bishop ML, Fody EP, Schoeff LE. *Clinical Chemistry – Principles, techniques and correlations*. 7 ed. Lippincott Williams and Wilkins; 2013.
112. Valeur B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Wiley-VCH; 2001.
113. Vázquez JL, Montero MT, Trias J, Hernández-Borrell J. 6-Fluoroquinolone–liposome interactions: fluorescence quenching study using iodide. *International Journal of Pharmaceutics*. 1998; 171:75–86.
114. Puchalski MM, Morra MJ, von Wandruszka R. Assessment of inner filter effect corrections in fluorimetry. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. 1991; 340(6):341–344.

115. Lovelle M, Mach T, Mahendran KR, Winterhalter M, Gameiro P. Interaction of cephalosporins with outer membrane channels of *Escherichia coli*. Revealing binding by fluorescence quenching and ion conductance fluctuations. *Phys Chem Chem Phys*. 2011; 13(4):1521–30.
116. Ohno T. Fluorescence Inner-Filtering Correction for Determining the Humification Index of Dissolved Organic Matter. *Environ. Sci. Technol*. 2002; 36(4):742–746.
117. Santos NC, Prieto M, Castanho MARB. Quantifying molecular partition into model systems of biomembranes an emphasis on optical spectroscopic methods. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2003; 1612:123–135.
118. Ong S, Liu H, Qiu X, Bhat G, Pidgeon C. Membrane Partition Coefficients Chromatographically Measured Using Immobilized Artificial Membrane Surfaces. *Anal. Chem*. 1995; 67(4):755–762.
119. Dubey AK, Eryomin VA, Taraschi TF, Janes N. Alcohol Binding to Liposomes by ²H NMR and Radiolabel Binding Assays: Does Partitioning Describe Binding? *Biophysical Journal*. 1996; 70(1):2307–2315.
120. Chen CY, Chen QZ, Wang XF, Liu MS, Chen YF. Synthesis, characterization, DNA binding properties, and biological activities of a mixed ligand copper(II) complex of ofloxacin. *Transition Metal Chemistry*. 2009; 34(7):757–763.
121. Lizondo M, Pons M, Gallardo M, Estelrich J. Physicochemical properties of enrofloxacin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1997; 15(12):1845–49.
122. Cohen Y, Weitman H, Afri M, Rudnick S, Talmon Y, Schmidt J, et al. The effect of intercalants on the host liposome. *J Liposome Res*. 2012; 22(4):306–18.
123. Bilski P, Martinez LJ, Koker EB, Chignell CF. Influence of solvent polarity and proticity on the photochemical properties of norfloxacin. *Photochem Photobiol*. 1998; 68(1):20-4.
124. Cuquerella MC, Miranda MA, Bosca F. Role of excited state intramolecular charge transfer in the photophysical properties of norfloxacin and its derivatives. *J Phys Chem A*. 2006; 110:2607–2612.
125. Park HR, Oh CH, Lee HC, Ryong Lim S, Yang K, Bark KM. Spectroscopic properties of various quinolone antibiotics in aqueous-organic solvent mixtures. *Photochem Photobiol*. 2004; 80(3):554-64.
126. Pávez P, Herrera B, Toro-Labbé A, Encinas MV. Structure and medium effects on the photochemical behavior of nonfluorinated quinolone antibiotics. *Photochem Photobiol*. 2007; 83(3):511-9.
127. Besenicar M, Macek P, Lakey JH, Anderluh G. Surface plasmon resonance in protein-membrane interactions. *Chem Phys Lipids*. 2006; 141(1-2):169-78.
128. Montero MT, Saiz D, Sitges R, Vázquez JL, Borrell JH. Influence of physicochemical properties of fluoroquinolones on encapsulation efficiency in liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*. 1996; 138:113-120.
129. Rodrigues C, Gameiro P, Reis S, Lima JLFC, de Castro B. Interaction of Grepafloxacin with Large Unilamellar Liposomes: Partition and Fluorescence Studies Reveal the Importance of Charge Interactions. *Langmuir*. 2002; 18:10231-10236.
130. Dror SB, Bronshtein I, Garini Y, O'Neal WG, Jacobi PA, Ehrenberg B. The localization and photosensitization of modified chlorin photosensitizers in artificial membranes. *Photochem Photobiol Sci*. 2009; 8(3):354-61.

131. de Almeida RFM, Loura LMS, Prieto M. Membrane lipid domains and rafts: current applications of fluorescence lifetime spectroscopy and imaging. *Chem Phys Lipids*. 2009; 157(2):61–77.
132. Merino-Montero S, Montero M, Hernández-Borrell J. Effects of lactose permease of *Escherichia coli* on the anisotropy and electrostatic surface potential of liposomes. *Biophysical Chemistry*. 2006; 119(1):101–105.
133. Kovács E, Savopol T, Iordache MM, Săplăcan L, Sobaru I, Istrate C, et al. Interaction of gentamicin polycation with model and cell membranes. *Bioelectrochemistry*. 2012; 87:230–235.
134. Mingeot-Leclercq MP, Schanck A, Ronveaux-Dupal MF, Deleers M, Basseur R, Ruyschaert JM, et al. Ultrastructural, physico-chemical and conformational study of the interactions of gentamicin and bis(beta-diethylaminoethylether) hexestrol with negatively-charged phospholipid layers. *Biochem Pharmacol*. 1989; 38(5):729–741.
135. Van Bambeke F, Tulkens PM, Basseur R, Mingeot-Leclercq MP. Aminoglycoside antibiotics induce aggregation but not fusion of negatively-charged liposomes. *Eur J Pharmacol*. 1995; 289(2):321–333.
136. Aramaki, Y, Tsuchiy S. Interactions between aminoglycosides and phospholipids using liposomes: a possible mechanism of nephrotoxicity. *Pharm. Res*. 1989; 6(5):362–366.
137. Vázquez JL, Montero MT, Merino S, Domènech O, Berlanga M, Viñas M, Hernández-Borrell J. Location and Nature of the Surface Membrane binding Site of Ciprofloxacin: A Fluorescence Study. *Langmuir*. 2001; 17:1009-1014.