

# 1

## Introdução

As fluorquinolonas são uma classe relativamente recente de antibióticos sintéticos com um alto potencial bactericida e com um amplo espectro de atuação contra conhecidos patógenos. São amplamente utilizadas para tratamento de infecções, especialmente do trato urinário, infecções gastrointestinais, do trato respiratório, contra doenças sexualmente transmissíveis e infecções na pele. São especialmente utilizadas quando há resistência ou mesmo intolerância à penicilina (Sharmam et al.; 2009; Oliphant e Green 2002).

Nos anos 60, o ácido nalidíxico (ácido 1-etil-7-metil-4-oxo-[1,8] naftiridina – 3 – carboxílico) foi a primeira quinolona obtida como um subproduto da síntese de cloroquina, um famoso antimalárico utilizado na época. A preparação mostrou ter atividade antibacteriana, exibindo moderada ação sobre as bactérias Gram-negativas e uma baixa absorção oral, com pico de concentração no plasma sanguíneo de 0,5 mg/ml, e, justamente por essas razões, não é utilizada contra infecções sistêmicas. Logo após o seu uso em unidades de tratamento intensivo, diversas bactérias apresentaram resistência a esse medicamento (Appelbaum e Hunter; 2000). Quinolonas promovem uma rápida inibição da síntese do DNA bacteriano, culminando com a morte celular. Diversos autores sugerem que as fluorquinolonas atuam sobre a DNA girase.

### 1.1

#### Fluorquinolonas

No início dos anos 80, com a introdução de um átomo de flúor no carbono 6 do ácido nalidíxico, surgiram as fluorquinolonas (FQ). São membros da família das quinolonas, mas possuem um maior espectro de atuação microbiótica tendo ação também sobre as bactérias Gram-positivas.

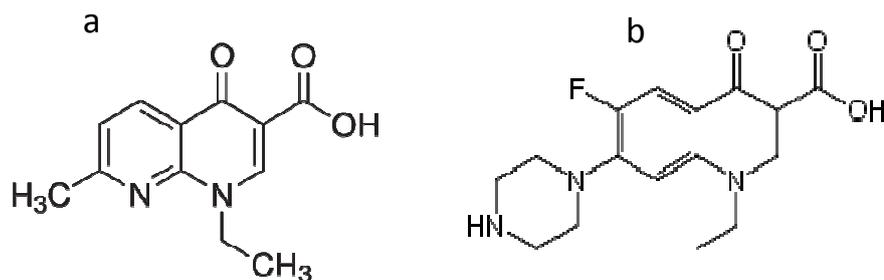


Figura 1.1. (a) Ácido nalidíxico (primeira quinolona sintetizada). (b) Norfloxacina, fluorquinolona de segunda geração.

Desde a década de 1960, o ácido nalidíxico (Fig. 1.1 a) foi alterado gerando novos antibióticos com maior espectro antimicrobiano e as mais diversas características. Um artigo de revisão sobre quinolonas (Oliphant e Green, 2002), classifica esses antibióticos em quatro gerações. A norfloxacina (Fig. 1.1 b), objeto de estudo deste trabalho, é tida como uma fluorquinolona de segunda geração e classe I, tendo atuação contra bactérias Gram-negativas e uma limitada ação contra as Gram-positivas, sendo comumente utilizada em infecções não severas do trato urinário, mas de uso limitado contra infecções sistêmicas.

### 1.1.1 Equilíbrio iônico das fluorquinolonas

A presença de múltiplos sítios de protonação nas FQs faz com que as mesmas sejam fortemente afetadas pelo equilíbrio ácido-base. Diversas técnicas, como potenciometria, espectroscopia, UV, RNM e fluorimetria, têm mostrado que o grupo carboxil e o 4-amino do anel piperazino são os mais importantes sítios de ligação de prótons (Albini e Monti; 2002).

A atividade das fluorquinolonas é altamente afetada por seu estado de carga (Barbosa et al., 1999). Em pH neutro, a espécie predominante é a zwitteriônica. Entretanto, as formas catiônica e aniônica são predominantes em pH ácido e básico, respectivamente.

## 1.1.2 Fotofísica das fluorquinolonas

### Espectros de absorção

Em solução aquosa, a forma zwitteriônica das fluorquinolonas apresenta uma intensa banda de absorção na região de 260-300 nm, com coeficiente de absorção molar  $2,0-2,5 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ , e uma fraca banda de absorção centrada em 320-340 nm com coeficiente de absorção molar de cerca de  $10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  (Albini e Monti; 2002).

A mudança de pH neutro para ácido induz uma mudança no espectro de absorção, visto que este é dependente da estrutura molecular. No entanto, não há variação no espectro de absorção quando o pH varia de neutro a básico, pelo menos até pH 11. No caso da norfloxacin, quando o pH é alterado de neutro para ácido, há um aumento na principal banda de absorção, além de um deslocamento para o vermelho e uma pequena redução na absorção da banda centrada em 320-340 nm.

### Fluorescência

A maioria dos membros da família das fluorquinolonas é naturalmente fluorescente e o seu espectro de emissão é extremamente dependente do seu equilíbrio iônico, i.e, do pH, seja no que concerne ao rendimento quântico, quanto à posição do pico de emissão. Quando em solução aquosa de alto pH ( $\text{pH} > 10$ ) a fluorescência da norfloxacin é muito pequena, indicando que quando a amina distal do anel piperazínico está desprotonada (neutra) a molécula é pouco fluorescente. Ademais Luiz (2009) mostrou que quando o pH do meio varia entre 5,0 e 7,6 os espectros de fluorescência podem ser obtidos como uma combinação linear dos espectros das formas catiônica e zwitteriônica desse antibiótico.

A intensidade da fluorescência das fluorquinolonas é dependente da força iônica, i.e., da concentração de íons na solução. Alguns ânions são conhecidos como supressores dinâmicos de fluorescência, (Lakowicz, 2006; Valeur, 2002), entretanto mecanismos de supressão estática por fosfato, por exemplo, também foram propostos na literatura (Monti et al., 2001).

É bem conhecida e bastante estudada a capacidade desses antibióticos de formarem complexos com íons metálicos, especialmente com  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,

$\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  (Batista et al., 2011). Muitos estudos têm mostrado como a complexação com cátions é capaz de alterar a biodisponibilidade e a penetração celular das quinolonas (Köpf-Maier, 1994). A complexação com esses metais alteram significativamente as propriedades luminescentes das fluorquinolonas, sendo essas alterações dependentes do tipo de cátion e do grau de ionização da FQ.

## 1.2

### **Complexos de fluorquinolonas com metais de transição**

Íons metálicos são conhecidos por afetarem a ação de diversas drogas. Em muitos casos a coordenação com metais de transição pode promover maior eficácia da droga. Depois da descoberta da atividade antitumoral do complexo inorgânico cis-diamino-dicloro-platina II (cisplatina), estão sendo investigados diversos outros complexos metálicos. Tem sido sugerido que há uma transferência do íon metálico para o vírus associado ao câncer e esse seria o principal mecanismo antitumoral desses complexos (Lumme et al., 1984).

Estudos mostram que há interação entre as quinolonas e íons metálicos. Por exemplo, tem-se observado uma diminuição na absorção da ciprofloxacina pelo organismo quando esta é administrada com antiácidos, especialmente que contenham magnésio e alumínio. O mesmo tem sido observado com cálcio, zinco e ferro. Possivelmente há uma complexação da ciprofloxacina com esses metais e o complexo é pobremente absorvido. Diversos estudos têm demonstrado a ação dos complexos de fluorquinolonas com metais de transição sobre a clivagem de DNA. Os complexos metálicos induzem um corte nas fitas de DNA e no caso de DNA de células cancerosas a clivagem impede a replicação rápida, induzindo a morte celular (Akinremi et al 2012).

## 1.3

### **Surfactantes**

O nome surfactante é uma aglutinação dos termos em inglês: “*surfaceactiveagent*” (surfactant). É também conhecido popularmente como detergente ou tensoativo (este último salientando uma das propriedades dos

surfactantes que é a de alterar a tensão superficial entre dois líquidos ou fases). Pertencem à família das moléculas anfifílicas, pois apresentam regiões com diferentes solubilidades e tais regiões estão distantes o suficiente uma da outra para serem tratadas como independentes, mesmo estando ligadas. Essas duas regiões distintas das moléculas, uma hidrofílica e outra hidrofóbica, são representadas na figura abaixo:

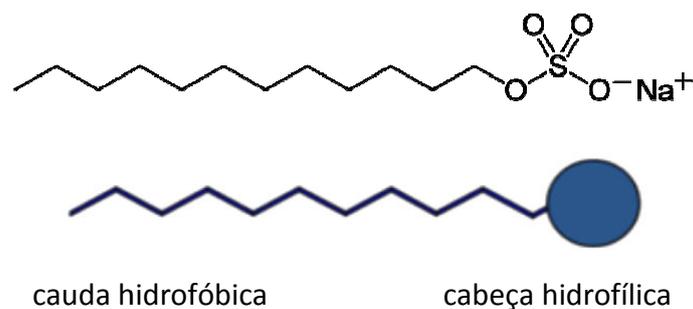


Figura 1.2. Dodecil sulfato de sódio (SDS), exemplo de um surfactante típico.

Há centenas de exemplos de aplicações dos surfactantes na vida humana, desde a regulação da pressão alveolar, como os pneumócitos II, que secretam surfactantes no interior dos alvéolos regulando a tensão superficial e assim permitindo que mais de trezentos milhões de alvéolos com diferentes tamanhos tenham a mesma pressão (Margarida Aires, 2012), à aplicação industrial, especialmente por sua capacidade de emulsificar dois líquidos não miscíveis. Também são utilizados para o processamento e entrega de drogas (Lukyanov e Torchilin; 2003). Até mesmo na culinária estão presentes.

Suas moléculas podem ser classificadas segundo a ionização que o grupamento hidrofílico sofre em solução aquosa, podendo ser:

- Surfactantes aniônicos: há um ou diversos grupos ionizáveis em solução aquosa que, uma vez dissociados, dá origem a um íon molecular com carga líquida negativa. Neste grupo, por exemplo, se encontra o dodecil sulfato de sódio (SDS). A molécula desse surfactante tem doze átomos de carbonos ligados a um grupamento sulfato, que sofre ionização em água dotando a molécula de uma carga líquida negativa. Essa extremidade é comumente chamada de ‘cabeça polar’, dada a sua afinidade pelas moléculas de água, enquanto a cadeia de carbonos é referida como ‘cauda apolar’, por sua característica hidrofóbica.

- Surfactantes catiônicos: seus grupos ionizáveis em solução aquosa formam um íon molecular catiônico. O brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) é um dos

integrantes desse grupo. Quando em solução aquosa o bromo sofre dissociação, dotando a molécula de uma carga líquida positiva. A cabeça polar é a região ao redor do nitrogênio. A cauda hidrofóbica contém 16 carbonos.

- Surfactantes zwitteriônicos: São os surfactantes que possuem diferentes grupos ionizáveis com cargas opostas. Nesse caso a carga elétrica total do íon molecular é nula, ainda que possuam momento de dipolo diferente de zero. No entanto, essa ionização é dependente do pH, podendo ter carga líquida total positiva, negativa ou nula.

- Surfactantes não iônicos: são aqueles que não possuem grupamentos dissociáveis em solução aquosa.

### 1.3.1 Micelas

Por conta das interações hidrofóbicas, os surfactantes tendem a formar agregados quando em solução e, a partir de uma determinada concentração, as propriedades físico-químicas, como condutividade elétrica, tensão superficial, pressão osmótica, capacidade de solubilização de solutos, viscosidade, espalhamento e absorção da luz, sofrem uma abrupta mudança (Mohr et al., 2007). Esse limiar em que as propriedades são bruscamente alteradas é conhecido como ‘concentração micelar crítica’ (CMC). Quando se atinge a CMC, tem início o processo de micelização que, como o próprio nome sugere, é a formação de micelas. Micelas (Fig. 1.3) são estruturas com alto grau de ordenação, possuindo um número médio de agregação, ou seja, um número médio de monômeros por micela. Quando se aumenta a concentração de surfactantes, ocorre a formação de novas micelas conservando o número médio de agregação (Boal, 2012).

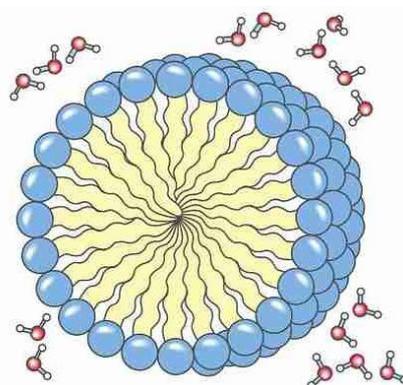


Figura 1.3. Representação de uma micela com as caudas apolares formando um compartimento hidrofóbico e as cabeças polares interagindo com as moléculas de água.

Os surfactantes tendem a se acumular na interface das diferentes fases, removendo sua parte hidrofóbica do contato com as moléculas de água e, dessa maneira, atingindo um mínimo de energia, um estado termodinamicamente mais favorável. O aumento da concentração de surfactante provoca um aumento na energia livre devido à interação desfavorável entre a região hidrofóbica e o ambiente aquoso, o que impele a uma organização das moléculas de surfactantes formando as micelas. O efeito hidrofóbico é o aumento de entropia atribuído à liberação de moléculas de água solvatando as cadeias carbônicas. Ao se agregarem, as regiões apolares das moléculas reduzem a área exposta à água e minimizam o seu efeito perturbador. As micelas em solução aquosa têm o seu núcleo apolar formado pela união das regiões hidrofóbicas dos surfactantes, fugindo do contato com as moléculas de água, e a superfície das micelas fica coberta pelos grupos hidrofílicos, sendo, portanto a parte que interage com o ambiente aquoso.

Há diferentes formatos possíveis para as micelas, sendo as globulares as mais comuns, mas podem-se encontrar micelas cilíndricas, elipsóides e em camadas (Boal, 2012). A agregação das moléculas de surfactantes – e, portanto, também a CMC – é uma função das condições do meio como pH, temperatura e força iônica, visto que tanto a energia livre quanto a entropia são funções dessas variáveis (Mohajeri e Noudeh, 2012).

## 1.4

### Objetivos

O presente trabalho se destina a estudar a interação entre a norfloxacina e seus complexos de cobre com micelas de surfactantes iônicos (SDS e CTAB). Para tanto, foram utilizadas técnicas espectroscópicas como absorção UV-Visível, fluorescência estacionária e fluorescência resolvida no tempo. Os objetivos, de modo geral, são avaliar a importância da cabeça polar do surfactante para essa interação e, no caso da norfloxacina livre, investigar também como suas diferentes espécies iônicas interagem com as micelas iônicas.

Mais especificamente, iremos determinar as constantes de associação entre a norfloxacin e as micelas desses surfactantes. Iremos investigar também como a formação dos complexos de cobre influenciam a associação às micelas.

Iremos obter a CMC desses surfactantes quando em interação com a NX e seus complexos, para averiguar a existência de interações pre-micelares.

A partir dos resultados, iremos propor modelos de estrutura da norfloxacin e de seus complexos quando associados à micela.

## 1.5

### **Estrutura dos capítulos**

No capítulo 2 se descreve o fenômeno da fluorescência, bem como os diversos processos que culminam com a relação da molécula excitada. Abrangendo fluorescência estacionária e resolvida no tempo;

No capítulo 3 se apresenta os materiais e métodos utilizados, bem como uma descrição dos aparelhos e técnicas usadas nesse trabalho

Os capítulos 4 e 5 se propõem a apresentar e discutir os dados experimentais encontrados e fazer um paralelo com o que há na literatura.

No capítulo 6 se apresentam as conclusões e expectativas futuras.