

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 15/03/2020.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP
Instituto de Química – Araraquara
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia

BEATRIZ CRISTINA PECORARO SANCHES

**Desenvolvimento e caracterização de lipossomas de ramnolipídeos
encapsulados com peptídeos inibidores de topoisomerases
bacterianas**

ARARAQUARA

2018

BEATRIZ CRISTINA PECORARO SANCHES

**Desenvolvimento e caracterização de lipossomas de ramnolipídeos
encapsulados com peptídeos inibidores de topoisomerasas
bacterianas**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Marchetto

Co-orientador: Prof. Dr. Jonas Contiero

ARARAQUARA

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

S211d	<p>Sanches, Beatriz Cristina Pecoraro</p> <p>Desenvolvimento e caracterização de lipossomas de ramnolipídeos encapsulados com peptídeos inibidores de topoisomerases bacterianas / Beatriz Cristina Pecoraro Sanches. – Araraquara : [s.n.], 2018</p> <p>86 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química</p> <p>Orientador: Reinaldo Marchetto</p> <p>Coorientador: Jonas Contiero</p> <p>1. Peptídeos. 2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>. 3. Biossurfactantes. 4. Lipossomas. 5. Peptídeos microbianos. I. Título.</p>
-------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Elaboração: Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Biblioteca do Instituto de Química, Unesp, câmpus de Araraquara

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

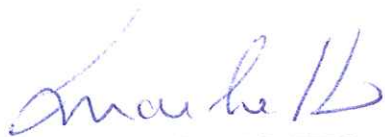
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Desenvolvimento e caracterização de lipossomas de ramnolipídios encapsulados com peptídeos inibidores de topoisomerases"

AUTORA: BEATRIZ CRISTINA PECORARO SANCHES

ORIENTADOR: REINALDO MARCHETTO

COORIENTADOR: JONAS CONTIERO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:



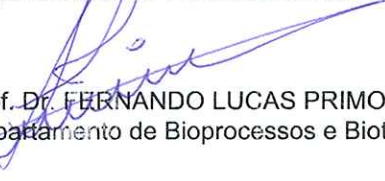
Prof. Dr. REINALDO MARCHETTO

Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. MARLUS CHORILLI

Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. FERNANDO LUCAS PRIMO

Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Araraquara, 15 de março de 2018

DADOS CURRICULARES

Beatriz Cristina Pecoraro Sanches

Dados Pessoais

Nome: Beatriz Cristina Pecoraro Sanches

Nome em citações bibliográficas: SANCHES, B.C.P

Endereço eletrônico: biapecorarosanches@gmail.com

Formação acadêmica/titulação

2016 - Atual

Mestrado em Biotecnologia.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química, Araraquara, São Paulo, Brasil. Título: Desenvolvimento e Caracterização de lipossomas de ramnolipídeos encapsulados com peptídeos inibidores de topoisomerasas bacterianas. Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Marchetto. Co-orientador: Prof. Dr. Jonas Contiero. Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

2016 - 2017

Especialização em Sustentabilidade e Agronegócios.

Universidade de Araraquara (UNIARA). Título: Energias Renováveis na atualidade: Uma análise crítica. Orientadora: Vanessa Colombo Corbi.

2012 - 2015

Graduação em Biotecnologia.

Universidade Federal de São Carlos, Araras, Brasil. Título: Efeito da concentração de açúcar e nitrato sobre a produção de etanol e ácido por linhagens de *Dekkera bruxellensis* em culturas submetidas à diferentes velocidades de agitação. Orientadora: Prof. Dr. Sandra Regina Ceccatto-Antonini. Bolsista: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Atuação Profissional

1. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP

2016 - 2018

Vínculo: bolsista;

Enquadramento funcional: mestranda.

2. Universidade Federal de São Carlos – UFSCar

2012 - 2015

Vínculo: voluntário;

Enquadramento funcional: membro do departamento de Relações Humanas e posteriormente, Diretora do Departamento Jurídico e Financeiro da Empresa Júnior de Biotecnologia (SUSTEC Jr).

2014 - 2015

Vínculo: voluntário;

Enquadramento funcional: estágio voluntário com biologia molecular, purificação de proteínas e mecanismos da *Neurospora crassa*, sob a orientação da Prof. Dr. Maria Célia Bertolini (UNESP, IQ).

2014 - 2014

Vínculo: bolsista;

Enquadramento funcional: monitora da disciplina Biologia Celular, sob a orientação da Prof. Dr. Silvana Perissato Meneghin (UFSCar, Araras).

2014 - 2014

Vínculo: voluntário;

Enquadramento funcional: estágio com citricultura, cultura de tecidos vegetais e técnicas de microenxertia, sob orientação da Prof. Dr. Alessandra Souza (IAC, Cordeirópolis).

Idiomas

Português: Lê bem, Compreende bem, Fala bem, Escreve bem.

Inglês: Lê bem, Compreende bem, Fala bem, Escreve bem.

Espanhol: Lê razoavelmente bem, Compreende bem, Fala bem, Escreve razoavelmente bem.

Prêmios e títulos

2017

1º Lugar entre os trabalhos apresentados na forma de painel no VII Congresso Farmacêutico da UNESP, com o trabalho intitulado “Estrutura e função da proteína GhoT de *Salmonella enterica*”, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

Produções

1. Artigos completos publicados em periódicos

FONSECA, RAFAEL F. ; MELO, CAIO C. B. ; **SANCHES, BEATRIZ B. C. P.** ; BERTUCCI-NETO, VICTOR ; FARINAS, CRISTIANE S. ; KWONG, WU H. . Modelling of Solid-State Fermentation over Wide Operational Range for Application in Process Optimization. CANADIAN JOURNAL OF CHEMICAL ENGINEERING **JCR**, v. 1, p. 1, 2018.

BASSI, Ana Paula Guarnieri ; Meneguello, L. ; Paraluppi, A.L. ; **Sanches, B.C.P.** ; **CECCATO-ANTONINI, S. R.** . Interaction of *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum*, *Dekkera bruxellensis* and feedstock on fuel ethanol fermentation. ANTONIE VAN LEEUWENHOEK INTERNATIONAL JOURNAL OF GENERAL AND MOLECULAR MICROBIOLOGY **JCR**, v. 1, p. 1-12, 2018.

2. Pedidos de Patente

SANCHES, B.C.P., SILVA, V.L., BRIAM-SALAZÁR, A.M., LOVAGLIO, R., SILVA, P.B., CHORILLI, M., CONTIERO, J., MARCHETTO, R. Peptides and rhamnolipids liposomes. Provisional Number: 62517264. U.S. Patent and Trademark Office. 2017.

3. Resumos publicados em anais de eventos

1. **SANCHES, B.C.P.**, SILVA, V.L., LOVAGLIO, R., CRUSCA, E., SILVA, P.B., CHORILLI, M., CONTIERO, J., MARCHETTO, R. Internalization of ParE toxin peptide analogue by rhamnolipids liposomes. SIMB, Denver, Colorado. 2017.(Apresentação de Trabalho/Outra).

2. **SANCHES, B.C.P.**, ROCHA, C.A., CARRIJO, R.S., BENITES, T.A., CRUSCA,E., SILVA, P.B., CHORILLI, M., CONTIERO, J., MARCHETO, R. Rhamnolipid liposomes: a vehicle for ParE toxin peptide analogue transport to bacterial cell. 2017. SBBq, Águas de Lindóia, São Paulo. (Apresentação de Trabalho/Outra).

3. CARRIJO, R. S.; ROCHA, C. A. ; CONCEICAO, M. B. ; **SANCHES, B. C. P.** ; BARBOSA, L. C. B. Estrutura e função da proteína GhoT de *Salmonella enterica*: uma toxina bacteriana implicada no fenômeno de persistência celular. In: VII Congresso Farmacêutico da UNESP, 2017, Araraquara. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", 2017. (Apresentação de Trabalho/Outra).

4. ROCHA, C.A., RAMOS, M.A.S., CRUSCA, E., TOLEDO, R.G., CARRIJO, R.S., **SANCHES, B.C.P.**, BAUAB, T.M., MARCHETTO, R., Effects of dimerization on the biological activity of the WRWYCRCK peptide. 2017. SBBq, Aguas de Lindóia, São Paulo (Apresentação de Trabalho/Outra).

5. BENITES, T. A. ; ZOTTIS, A. ; MARCHETTO, R. ; **SANCHES, B. C. P.** . Study of computacional mutations to increase ParD antitoxin affinity. 2017. SBBq, Águas de Lindóia, São Paulo (Apresentação de Trabalho/Outra).

6. SANCHES, B. C. P.; Ceccato-Antonini, S. R. ; BASSI, A. P. Efeito da concentração de açúcar e nitrato sobre a produção de etanol e ácido por linhagens de *Dekkera bruxellensis* em culturas submetidas à diferentes velocidades de agitação. 2015. CIC, São Carlos (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

7. SANCHES, B. C. P.; BASSI, A. P. ; Ceccato-Antonini, S. R. . Cell growth and alcohol production is differently dependent on the level of agitation and glucose concentration in *Dekkera bruxellensis*. In: International Union of Microbiological Societies, 2014, Montréal. Cell growth and alcohol production is differently dependent on the level of agitation and glucose concentration in *Dekkera bruxellensis*, 2014. IUMS, Québec, Canada (Apresentação de Trabalho/Outra).

Participação em eventos científicos:

- VII Rotas Tecnológicas da Biotecnologia. Parque Supera. 2018 (Evento);
- 46° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq – Evento);
- VII Congresso Farmacêutico da UNESP. 2017 (Congresso);
- Workshop de Caracterização de Macromoléculas com Foco em Estabilidade Estrutural e Afinidade de Interações, com Uso de nanoDSF e Termoforese em Microescala (CNPEM). 2016 (Outra);
- Four Biotec: Quatro Dias pela Biotecnologia. UFSCar. 2016. (Outra);
- SINAFERM. 2015. (Simpósio);
- International Union of Microbiological Societies Congresses. 2014. (Congresso);
- Simpósio de Biotecnologia Forense. 2014. (Simpósio);
- Terra e Alimentos. 2014. (Outra);
- SMA – Simpósio de Microbiologia Aplicada. UNESP, Rio Claro. 2013 (Simpósio).

À meus pais, Isabel e Luiz Cláudio, que nunca mediram esforços
para me auxiliar nesta caminhada.

À meu irmão, Bernardo, que sempre me guiou e
me ajudou a seguir em frente.

Vocês são a razão da minha vida,

Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela força e perseverança concedida.

Aos meus pais: Isabel e Luiz Cláudio, meu irmão: Bernardo, meu namorado: Rafael e pets: Thor e Tobi, por clarearem meus dias mais escuros com paciência e bom humor. Aos meus familiares, Tio Pedro, Tio Egídio e Tia Sônia pela ajuda.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Reinaldo Marchetto e ao meu co-Orientador, Prof. Dr. Jonas Contiero pela oportunidade de realizar o presente trabalho, por terem me acolhido em seus respectivos grupos de pesquisa, pela paciência, disposição e conhecimentos a mim concedidos durante esses anos.

Ao Prof. Dr. Marlus Chorilli por ter colaborado conosco durante esses anos, além de estar sempre presente para me motivar e passar seus valiosos conhecimentos.

À Patrícia Bento, Vinícius Silva e Roberta Lovaglio por terem me auxiliado grandemente na execução deste trabalho, sendo super pacientes e dedicados. Sem vocês tudo teria sido muito mais difícil!

Aos meus companheiros de laboratório Milena, Bianca, Rodolfo, Jesseleine, Aline, Camila, Thaís, Greg, Caio, Leonardo, Carol, Sara, Crusca, Norival, Paulo, Matheus pelos bons momentos e boa convivência.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Industrial de Rio Claro.

Àos professores Rodrigo Portugal, Ana Marisa Fusco, pelo apoio com os experimentos conduzidos.

Às minhas amigas de infância Cat, Vivi e Lalis por todo apoio.

Às amigas de Rio Claro por me hospedarem gratuitamente em suas respectivas residências.

Aos amigos da AIESEC por todo apoio.

Aos amigos do Departamento de Físico-Química e do Departamento de Farmacotécnica por todo conhecimento passado.

Aos funcionários da Secretária de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Zilda, Tarcísio e Val.

Aos demais funcionários do Instituto de Química de Araraquara.

À CAPES pela Bolsa Concedida.

RESUMO

O sistema ParE-ParD é um sistema toxina-antitoxina (TA) onde ParE atua como a toxina e ParD a antitoxina. ParE tem comprovada atividade de inibição do sítio catalítico das enzimas DNA girase e Topoisomerase IV (Topo IV), sendo esta uma atividade que pode ser aproveitada para fins terapêuticos. ParELC3, um peptídeo derivado à ParE também apresenta esta habilidade de inibição enzimática *in vitro*, contudo, experimentos também comprovam a dificuldade de permeabilidade e alta complexidade estrutural que este material apresenta, o que pode ser um problema para sua aplicação para fins terapêuticos. Assim, com a intenção de viabilizar o potencial biotecnológico deste peptídeo, foi feita sua incorporação em lipossomas compostos majoritariamente por ramnolipídeos. Este biotensoativo, produzido pela rota fermentativa da *Pseudomonas aeruginosa*, foi selecionado por ser considerado “sustentável”, ter atividade antimicrobiana intrínseca e ainda ser pouco empregado para fins nanotecnológicos. Ensaio de caracterização físico-química e morfológica, via espalhamento de luz dinâmica (DLS), microscopia eletrônica e transmissão (MET) e microscopia eletrônica de transmissão-crio (MET- Crio) dos lipossomas foram realizados e comprovou-se a formação de bicamadas unilamelares. Ensaio de eficiência de encapsulação mostraram que os sistemas lipossomais incorporaram entre 44 e 61% de ParELC3. Em relação à atividade antimicrobiana, as versões de ParELC3 incorporado nos lipossomas de ramnolipídeos foram mais eficientes frente a *E. coli* e *S. aureus* quando comparados à atividade antimicrobiana de ParELC3 livre. Realizou-se estudos de estabilidade e de liberação prolongada do sistema lipossomal, e comprovou-se que os lipossomas prolongam a liberação de ParELC3, mantendo a estabilidade média dos mesmos por até 20 dias. Mostrou-se que na concentração dos experimentos, os lipossomas compostos de ramnolipídeos não são tóxicos para células HepG2, assim como o peptídeo ParELC3 livre. Acredita-se que com o lipossoma obtido com ParELC3 pode ser utilizado no combate às infecções bacterianas.

Palavras chave: peptídeos. sistema toxina-antitoxina. ramnolipídeos. lipossomas. atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

ParE-ParD system is a toxin-antitoxin (TA) system where ParE acts as a toxin and ParD as an antitoxin. ParE can inhibit the catalytic site of DNA gyrase and Topoisomerase IV (Topo IV) enzymes, which can be useful for pharmaceutical applications. ParELC3, an analogue peptide from ParE also has this *in vitro* enzymatic inhibition ability, but, has also a permeability difficult and high structural complexity, which can be a problem for its therapeutic application. So, pretending to use the biotechnological potential of this peptide, its internalization in liposomes composed mainly by rhamnolipids was proposed. This biosurfactant, produced by the fermentative route of *Pseudomonas aeruginosa*, was selected for being considered "sustainable", for its intrinsic antimicrobial activity and low toxicity, in addition to not being employed for nanotechnological experiments. Physico-chemistry and morphological characterization assays were done by dynamic light scattering (DLS), transmission electronic microscopy (TEM) and transmission electronic microscopy – Cryo (TEM – Cryo), then, bilayers production was improved. Encapsulation efficiency tests showed that liposomal systems can incorporate efficiently between 44 e 61% of ParELC3. In relation to the antimicrobial activity, versions of internalized ParELC3 into liposomes composed mainly by rhamnolipids were more efficient than compared to antimicrobial activity for free ParELC3, both for *E coli* and *S aureus* bacteria representatives. In function of these promising results, was proposed to do stability and drug release assays, and results showed that liposomes prolonged the ParELC3 liberation and their average stability is around 20 days. The results still showed that at the concentration tested, liposomes constituted mainly by rhamnolipids are not toxic to HepG2 cells, neither for ParELC3 peptide. We believe that these systems, where liposomes are encapsulated with ParELC3, can be used against bacterial infections.

Key words: peptides. toxin-antitoxin systems. rhamnolipids. liposomes. antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática do mecanismo de morte pós-segregacional	25
Figura 2 - Estrutura primária de ParE e de ParD de <i>Escherichia coli</i> (plasmídeo RK2)	26
Figura 3 - Esquema de um lipossoma e os locais de incorporação de substâncias.28	
Figura 4 - Estrutura dos quatro principais ramnolipídeos produzidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
Figura 5 - Estrutura primária dos peptídeos derivados de ParE	33
Figura 6 - Esquema ilustrativo da SPFS, utilizando a estratégia Fmoc	34
Figura 7 – Curva de calibração do peptídeo ParELC3 via UV – Visível, sob comprimento de onda de 280 nm.....	42
Figura 8 - Fluxograma para determinação da atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição	44
Figura 9 - Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo ParELC3 (A) antes e (B) após a purificação. Coluna de fase reversa Shimadzu C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å). Gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 1,0 ml.min ⁻¹ e detecção a 220 nm. Condições da purificação: Coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18 (250 x 10 mm; 10 µm; 300 Å) com gradiente linear de 35 a 65% de componente orgânico (acetonitrila; água; 0,036% TFA), em 90 minutos, fluxo de 3,0 mL.min ⁻¹ e detecção a 220 nm.....	50
Figura 10 - Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo ParELC3W (A) antes e (B) após a purificação. Coluna de fase reversa Shimadzu C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å). Gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 1,0 ml.min ⁻¹ e detecção a 220 nm. Condições da purificação: Coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18 (250 x 10 mm; 10 µm; 300 Å) com gradiente linear de 35 a 65% de componente orgânico (acetonitrila; água; 0,036% TFA), em 90 minutos, fluxo de 3,0 mL.min ⁻¹ e detecção a 220 nm	50
Figura 11 - Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo ParELC3-CF (A) antes e (B) após a purificação. Coluna de fase reversa Shimadzu C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å). Gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 1,0 ml.min ⁻¹ e detecção a 220 nm. Condições da purificação: Coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18 (250 x 10 mm; 10 µm; 300 Å) com gradiente linear de 35 a 65% de componente orgânico (acetonitrila; água; 0,036% TFA), em 90 minutos, fluxo de 3,0 mL.min ⁻¹ e detecção a 220 nm.	51

Figura 12 - Determinação da concentração mínima inibitória do peptídeo ParELC3 (A) e ParELC3W (B) sobre atividade da DNA girase. Volume de reação de 30 µL contendo: C1: controle positivo (plasmídeo pBR322 relaxado); C2: controle negativo (plasmídeo pBR322 relaxado e a enzima DNA girase); os valores em cada aplicação no gel representam a concentração de cada um dos peptídeos em µmol.L⁻¹53

Figura 13 - Determinação da concentração mínima inibitória do peptídeo ParELC3 (A) e ParELC3W (B) sobre atividade da Topoisomerase IV. Volume de reação de 30 µL contendo: C1: controle positivo (plasmídeo pBR322 superenovelado); C2: controle negativo (plasmídeo pBR322 superenovelado e a enzima Topo IV); os valores em cada aplicação no gel representam a concentração de cada um dos peptídeos em µmol.L⁻¹54

Figura 14 - Micrografias obtidas por MET-Convencional para amostras de lipossomas livres. Formulações: A: Ramnolipidio; B: Ramnolipídeo + PC; C: Ramonolipídeo + Colesterol; D: Ramnolipidio + PC + Colesterol.....62

Figura 15 - Micrografias obtidas por Crio-EM para amostras de lipossomas de ramnolipídeos (formulação A) vazios63

Figura 16 - Atividade antibacteriana dos lipossomas produzidos via sonicação e extrusão e incorporados com ParELC3 frente aos microrganismos *E. coli* e *S. aureus* pelo ensaio de “*Time Killing*”. (Controle de crescimento: (+) Meio+suspensão bacteriana; (-) ciprofloxacina (100 µmol.L⁻¹)69

Figura 17 - Estabilidade das formulações lipossomais A, B, C e D (tamanho das partículas e polidispersão) durante 30 dias, sob armazenamento em 4°C.....71

Figura 18 - Liberação prolongada de ParELC3W dos sistemas lde formulações A, B, C e D (Tabela 1) conduzidos via sonicação73

Figura 19 - Fotomicrografias analisadas por microscopia confocal frente a *Escherichia coli* O157:H17 (ATCC 43895) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458) tratadas com ParELC3-CF incorporado nas formulações de lipossomas A, B, C, D e ParELC3-CF livre (representado pela letra E)74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição dos lipossomas selecionados para caracterização físico-química.....	38
Tabela 2 - Massas moleculares teóricas e obtidas por espectroscopia de massas dos peptídeos ParELC3, ParELC3W e ParELC3-CF	52
Tabela 3 - Comparação da atividade inibitória dos peptídeos ParELC3 e ParELC3W em topoisomerasas bacterianas.....	54
Tabela 4 - Variação do diâmetro hidrodinâmico e do potencial zeta dos lipossomas preparados por sonicação em função da formulação.....	57
Tabela 5 - Variação do diâmetro hidrodinâmico e do potencial zeta dos lipossomas preparados por extrusão em função da formulação	57
Tabela 6 - Variação do Diâmetro Hidrodinâmico e do potencial Zeta (ζ) de lipossomas preparados por sonicação e adição do peptídeo ParELC3W	60
Tabela 7 - Variação do Diâmetro Hidrodinâmico e do potencial Zeta (ζ) de lipossomas preparados por extrusão e adição do peptídeo ParELC3W	60
Tabela 8 - Eficiência de encapsulação do peptídeo ParELC3W em diferentes lipossomas	64
Tabela 9 - Atividade antibacteriana dos lipossomas produzidos via sonicação e incorporadas com ParELC3 frente a <i>Escherichia coli</i> . As formulações dos lipossomas foram: A: Ramnolipídio; B: Ramnolipídeo + PC; C: Ramonolipídeo + Colesterol; D: Ramnolipídio + PC + Colesterol; Controles: “LB” corresponde às formulações sem peptídeo incorporado, na concentração de 2,6 mmol.L ⁻¹ de ramnolipídeo; R corresponde à solubilização do Ramnolipídeo em PBS a 2,6 mmol.L ⁻¹ , sem uso da sonicação	65
Tabela 10 - Atividade antibacteriana dos lipossomas produzidos via sonicação e incorporadas com ParELC3 frente a e <i>Staphylococcus aureus</i> . As formulações dos lipossomas foram: A: Ramnolipídio; B: Ramnolipídeo + PC; C: Ramonolipídeo + Colesterol; D: Ramnolipídio + PC + Colesterol; Controles: “LB” corresponde às formulações sem peptídeo incorporado, na concentração de 2,6 mmol.L ⁻¹ ; R corresponde à solubilização do Ramnolipídeo em PBS a 2,6 mmol.L ⁻¹ , sem uso da sonicação	66
Tabela 11 - Atividade antibacteriana dos lipossomas produzidos via extrusão e incorporadas com ParELC3 frente a <i>Escherichia coli</i> . As formulações dos lipossomas foram: A: Ramnolipídio; B: Ramnolipídeo + PC; C: Ramonolipídeo + Colesterol; D: Ramnolipídio + PC + Colesterol; Controles: “LB” corresponde às formulações sem peptídeo incorporado, na concentração de 2,6 mmol.L ⁻¹ ; R corresponde à solubilização do Ramnolipídeo em PBS a 2,6 mmol.L ⁻¹ , sem uso da extrusão.....	66

Tabela 12 - Atividade antibacteriana dos lipossomas produzidos via extrusão e incorporadas com ParELC3 frente a *Staphylococcus aureus*. As formulações dos lipossomas foram: A: Ramnolipídio; B: Ramnolipídeo + PC; C: Ramonolipídeo + Colesterol; D: Ramnolipídio + PC + Colesterol; Controles: “LB” corresponde às formulações sem peptídeo incorporado, na concentração de 2,6 mmol.L⁻¹; R corresponde à solubilização do Ramnolipídeo em PBS a 2,6 mmol.L⁻¹, sem uso da extrusão67

Tabela 13 - Avaliação da citotoxicidade das formulações lipídicas A, B, C, D, ParELC3 livre e formulações vazias (LB) frente a células de HepG276

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1 Topoisomerases	23
1.2 Sistema Toxina-Antitoxina (TA).....	24
1.3 Lipossomas e a encapsulação de substâncias.....	27
1.4 Ramnolipídeos	29
2. OBJETIVOS	32
Objetivos específicos	32
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Síntese, purificação e caracterização de peptídeos	33
3.2 Ensaio de inibição de atividade da DNA girase	36
3.3 Ensaio de inibição da atividade da Topoisomerase IV	36
3.4 Produção do Ramnolipídeo	37
3.5 Preparo de lipossomas.....	38
3.6 Caracterização dos Sistemas de lipossomas.....	39
3.6.1 Espalhamento de luz dinâmico (DLS).....	39
3.6.2 Potencial Zeta (ζ).....	40
3.6.3 Microscopia eletrônica de transmissão convencional e crio .	40
3.7 Eficiência de Incorporação.....	41
3.8 Teste de Microdiluição em Placas	42
3.9 Ensaio de “Time Killing”	44
3.10 Ensaio de Estabilidade	45
3.11 Ensaio de Liberação Prolongada	45
3.12 Microscopia Confocal de Varredura a <i>Laser</i> (MCVL)	46
3.13 Ensaio de Citotoxicidade	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 Síntese, purificação e caracterização de peptídeos	48
4.2 Ensaio de inibição das atividades das enzimas DNA girase e Topoisomerase IV	52
4.3 Desenvolvimento das Formulações Lipídicas	55
4.4 Caracterização dos Sistemas Lipossomais: Tamanho e Potencial Zeta (ζ).....	56
4.5 Caracterização dos Sistemas Encapsulados: Tamanho e Potencial Zeta(ζ).....	59

4.6	Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	61
4.7	Eficiência de Incorporação	63
4.8	Ensaio de Inibição de Crescimento Bacteriano	64
4.9	Ensaio de “ <i>Time Killing</i> ”	68
4.10	Estabilidade dos lipossomas.....	70
4.11	Ensaio de Liberação Prolongada	72
4.12	Microscopia Confocal de Varredura a <i>Laser</i> (MCLV)	73
4.13	Ensaio de Citotoxicidade	75
5.	CONCLUSÕES.....	77
6.	REFERÊNCIAS	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1. Aminoácidos

Ala (A) - alanina

Arg (R) – arginina

Asn (N) – asparagina

Asp (D) – ácido aspártico

Cys (C) – cisteína

Gln (Q) – glutamina

Glu (E) – ácido Glutâmico

Gly (G) – glicina

His (H) – histidina

Ile (I) – isoleucina

Leu (L) – leucina

Lys (K) – lisina

Met (M) – metionina

Phe (F) – fenilalanina

Pro (P) – prolina

Ser (S) – serina

Thr (T) – treonina

Trp (W) – triptofano

Tyr (Y) – tirosina

Val (V) – valina

2. Outras terminologias

CF – carboxifluoresceína

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

DCM – diclorometano

DIC – N,N'-diisopropilcarbodiimida

DMF – dimetilformamida

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucleico

EDTA – ácido etilenodiaminotetraacético
Fmoc – 9-fluorenilmetiloxycarbonila
Fmoc-AA – Fmoc-aminoácido
GUV – vesícula unilamelar gigante
GyrA – subunidade A da DNA girase
GyrB – subunidade B da DNA girase
HOBt – N-hidroxibenzotriazol
LUV – vesícula unilamelar grande
MCVL – microscopia confocal de varredura a *laser*
MET – microscopia eletrônica de transmissão
MLV – vesícula multilamelar
mRNA – ácido ribonucleico mensageiro
ParED – ParE/ParD
PBS – tampão fosfato-salino
PC – fosfatidilcolina
RL – ramnolipídeo
RNA – ácido ribonucleico
SBF – soro bovino fetal
SDS – dodecil sulfato de sódio
SPFS – síntese de peptídeos em fase sólida
SUV – vesícula unilamelar pequena
TA – sistema toxina-antitoxina
TBE – tampão tris-borato-EDTA
tBu – terc-butila
TFA – ácido trifluoroacético
TFE – trifluoroethanol
Topo IV – Topoisomerase IV
TRIS – tris(hidroximetil)metilamina

1. INTRODUÇÃO

A resistência aos antimicrobianos constitui hoje um dos maiores desafios da medicina e das indústrias farmacêuticas (KHAN; SIDDIQUI, 2012; FAIR; TOR, 2014; MARTÍNEZ; BAQUERO, 2014). O combate a doenças provocadas por infecções microbianas vem sendo o objetivo de muitos estudos e isso ocorre, em grande parte, pelo surgimento de microrganismos multirresistentes aos medicamentos existentes no mercado (LOHNER; STAUDEGGER, 2001).

A resistência aos antimicrobianos, um fenômeno natural, está relacionada à existência de diferentes mecanismos bioquímicos que inibem a ação dos antimicrobianos (LORENZÓN, 2015). Os mecanismos descritos hodiernamente na literatura seriam: mutações, que resultam em modificações no material genético dos microrganismos; transferência de genes, causada por mecanismos de transdução, transformação e conjugação de elementos genéticos como plasmídeos e transposons (CUNHA, 1998; MARTINEZ, 2012); ou ainda, um mecanismo que vem sendo estudado mais recentemente, que seria a persistência bacteriana, fenômeno que está diretamente ligado à sistemas Toxina-Antitoxina presentes em bactérias patogênicas e pode conferir à elas tolerância temporária a antibióticos (WANG; WOOD, 2011; YAMAGUCHI et al., 2011).

Segundo estimativas, até 2050 serão atribuídas à resistência antimicrobiana cerca de 10 milhões de mortes por ano (O' NEIL, 2014). Além disso, o cenário atual demonstra que estamos inseridos em uma era pós-antibióticos, já que o número de novos antibióticos no mercado diminuiu significativamente nos últimos anos (LUEPKE et al., 2017), sendo que na década de 2000 somente dez novas entidades de fármacos foram aprovadas, o que fez com que a Organização Mundial de Saúde (OMS) incluísse os agentes antimicrobianos na lista de medicamentos prioritários para o mundo (KAPLAN et al., 2013).

Assim, é de vital importância a busca por substâncias naturais ou sintéticas que exibam atividades antimicrobianas específicas e, acima de tudo, que sejam resistentes aos microrganismos patogênicos que existem na atualidade, além de prezar pela baixa toxicidade, seletividade e qualidade de vida do futuro consumidor.

Neste contexto, as toxinas encontradas em organismos vivos são uma grande promessa para alcançar estes objetivos. Dentre estas toxinas, a proteína bacteriana ParE (JOHNSON et al., 1996), que exerce sua função citotóxica sobre um grupo de

enzimas denominado topoisomerasas, constitui um exemplo importante da riqueza química e biológica para o desenvolvimento de novas estratégias no desenho de potenciais agentes antimicrobianos que podem vir a complementar a ação dos antibióticos já existentes (CUDIC et al., 2002).

1.1 Topoisomerasas

As topoisomerasas constituem um grupo de enzimas que se tornou alvo efetivo para vários agentes terapêuticos. Tais enzimas estão presentes em todos os tipos de células e catalisam mudanças topológicas no DNA, imprescindíveis ao metabolismo e, portanto, para a viabilidade celular (WANG, 1985).

Estas enzimas, com base em seus mecanismos de ação, podem ser divididas em subfamílias. As topoisomerasas do tipo I, que agem catalisando a quebra transitória de uma das fitas do DNA e as do tipo II que catalisam a quebra simultânea das duas fitas do DNA, reunindo-as posteriormente.

A DNA girase é um clássico representante das topoisomerasas do tipo II, descoberta em *Escherichia coli* por GELLERT e colaboradores em 1976, e diferentemente das demais topoisomerasas, é a única capaz de introduzir super-hélices negativas no DNA (GELLERT et al., 1976; MAXWELL, 1997), e na ausência de ATP é capaz de relaxar negativamente o DNA plasmidial superenovelado (MAXWELL, 1997). Esta enzima desempenha um papel essencial para os passos de iniciação e alongação durante a replicação do DNA, assim como também para os processos de condensação e segregação, sendo, portanto de fundamental importância para a manutenção celular.

O estudo das topoisomerasas se expandiu nos campos da farmacologia e medicina clínica por meio da identificação da DNA girase bacteriana como alvo para antibióticos e algumas toxinas. A DNA girase é encontrada em todas as bactérias e ausentes em eucariotos. Mais especificamente, é uma enzima homóloga às topoisomerasas II de células eucarióticas, diferindo destas, em relação à sua região de interação com o DNA (LEVINE et al., 1998). Daí sua importância como alvo para agentes antimicrobianos, já que esta diferença permite uma ótima toxicidade seletiva para microrganismos.

Posteriormente, Kato e colaboradores descobriram um homólogo da DNA girase, a topoisomerase IV (Topo IV), capaz de relaxar o supernovelamento do DNA, facilitando, assim, os processos de replicação e transcrição (KATO et al, 1990; KATO et al, 1992). Apesar da semelhança estrutural e do mecanismo catalítico, as enzimas diferem em uma maneira fundamental: DNA girase, durante sua ação, envolve o DNA em torno de si, enquanto a topoisomerase IV não (PENG; MARIANS, 1995).

As perspectivas para o desenvolvimento de novos fármacos com ação antibacteriana incluem o estudo aprofundado da ação das proteínas naturais produzidas por microrganismos, incluindo as que têm como alvo a DNA girase, e mais recentemente a Topo IV, dentre as quais se encontra a toxina ParE, que conjuntamente à antitoxina ParD, constitui o denominado sistema toxina-antitoxina ParE-ParD.

1.2 Sistema Toxina-Antitoxina (TA)

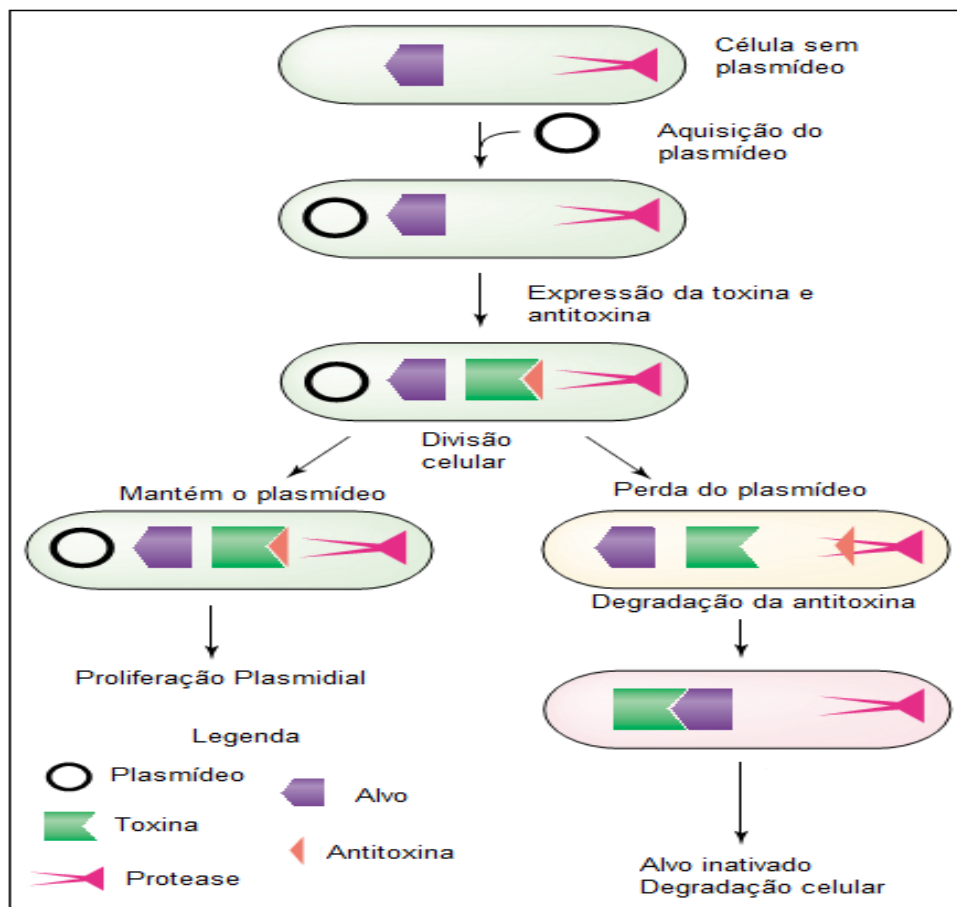
Amplamente difundidos em organismos procarióticos, os sistemas toxina-antitoxina (TA) são importantes módulos genéticos formados, geralmente, por dois elementos, sendo eles uma toxina e uma antitoxina (YAMAGUCHI et al, 2011). Em células que exibem crescimento normal, a toxina é normalmente neutralizada pela antitoxina. Contudo, em várias condições de estresse, as antitoxinas são rapidamente degradadas por proteases ou RNases, dependendo da sua natureza, deixando, dessa forma, as toxinas livres para agirem sobre seus alvos com consequente interferência em processos celulares fundamentais, como a replicação do DNA, tradução e produção de ATP (HAYES, 2003; BARBOSA et al., 2014; MASUDA; INOUYE, 2017).

Os sistemas TA foram descobertos inicialmente em plasmídeos como um mecanismo de manutenção destes fragmentos de DNA extracromossomais, processo denominado de morte pós-segregacional, ou morte celular programada (Figura 1). Posteriormente, também foram encontrados nos cromossomos de bactérias e arqueobactérias, atuando em outros eventos celulares importantes, tais como, a formação de biofilmes, proteção contra bacteriófagos, reparação do DNA

cromossomal e resposta a condições adversas (PAGE; PETI, 2016; BUSTAMANTE; IREDELL, 2017).

No caso do processo de morte celular programada, os sistemas TA exercem uma função essencial na manutenção dos plasmídeos, em virtude da sua capacidade em matar ou inibir o crescimento de uma célula filha que não recebe uma cópia do plasmídeo durante o processo de divisão celular (PANDEY; GERDES, 2005). Após a divisão celular, cada célula filha deverá herdar alguns dos complexos toxina-antitoxina do citoplasma. Se uma célula filha não herda uma cópia do plasmídeo, a síntese da antitoxina não é mais possível (WILBAUX et al., 2007). Por ser menos estável, a antitoxina é degradada, resultando na liberação da toxina, que ficará livre para agir no seu alvo e exercer a sua função, inibindo um determinado processo celular, consequentemente levando a célula à morte (Figura 1).

Figura 1 – Representação esquemática do mecanismo de morte pós-segregacional



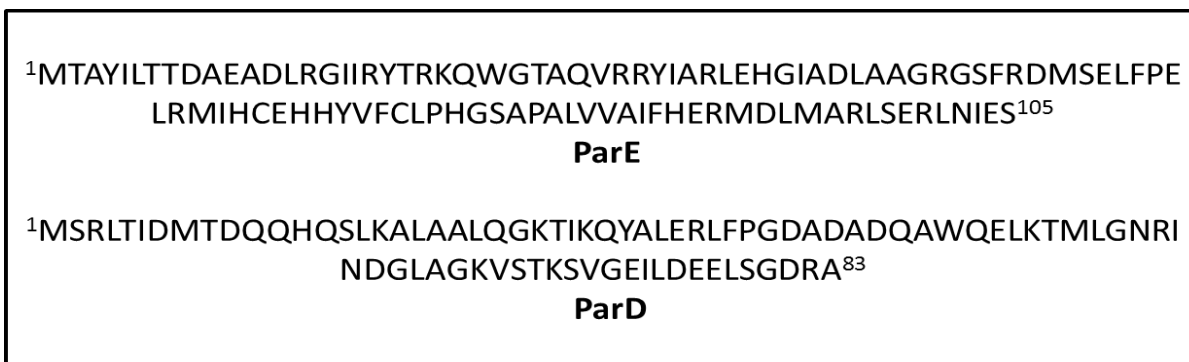
Fonte: Adaptado de Buts et al. (2005).

Assim, os módulos TA podem ser compreendidos basicamente como entidades genéticas que regulam o crescimento celular em procariotos.

Um exemplo de sistema TA é o sistema ParE/ParD, identificado no plasmídeo RK2 de uma gama de procariotos, sendo ParE (103 aminoácidos) a toxina e ParD (83 aminoácidos) a antitoxina (Figura 2). ParE tem sua atividade neutralizada pela ação de ParD. ParE apresenta atividade citotóxica no processo de replicação do DNA, por interferir na ação da DNA girase, possivelmente interagindo com uma das subunidades da enzima, estabilizando o denominado “complexo clivável” (JIANG et al., 2002).

Neste sentido, o desenho racional e a síntese química de derivados de ParE, estruturalmente mais simples, surgiu como um meio alternativo, na obtenção de moléculas modelo para estudos de interação com a DNA girase, além de poderem servir como um caminho para o desenvolvimento de novos derivados peptídicos que possuam como alvo as DNA topoisomerasas bacterianas.

Figura 2 - Estrutura primária de ParE e de ParD de *Escherichia coli* (plasmídeo RK2)



Fonte: Elaborado pela autora

Desta forma, uma série de peptídeos derivados desta proteína tem sido desenhados e sintetizados quimicamente com a finalidade de se obter o melhor derivado com potencial atividade inibitória sobre a DNA girase (BARBOSA et al., 2012). Resultados promissores foram obtidos em termos de inibição da atividade desta enzima. *In vitro*, os valores de concentração para inibição total (IC₁₀₀) foram entre 10 e 25 µmol.L⁻¹ para o peptídeo denominado ParELC3, porém ensaios *in vivo*

foram insatisfatórios, basicamente devido à baixa permeabilidade da membrana celular bacteriana a estes peptídeos (BARBOSA et al., 2012).

Dada esta dificuldade, a encapsulação destes peptídeos em sistemas carreadores, tal como lipossomas, poderia ajudar a superar a baixa permeabilidade da membrana, integrando-se a ela, de tal forma a permitir o transporte dos peptídeos ao interior da célula e facilitar a acessibilidade destas moléculas ao seu alvo intracelular.

1.3 Lipossomas e a encapsulação de substâncias

Os lipossomas são estruturas vesiculares e microscópicas formadas, basicamente, por fosfolipídios organizados em bicamadas concêntricas que circundam compartimentos aquosos. Os lipossomas podem conter uma única bicamada lipídica ou bicamadas múltiplas em torno do compartimento aquoso interno e, portanto, são classificados em unilamelares e multilamelares, respectivamente (FRÉZARD et al., 2005). Quanto ao tamanho, as vesículas unilamelares podem ser pequenas ou grandes, sendo caracterizadas como lipossomas unilamelares pequenos - SUV (small unilamellar vesicles) e lipossomas unilamelares grandes - LUV (large unilamellar vesicles).

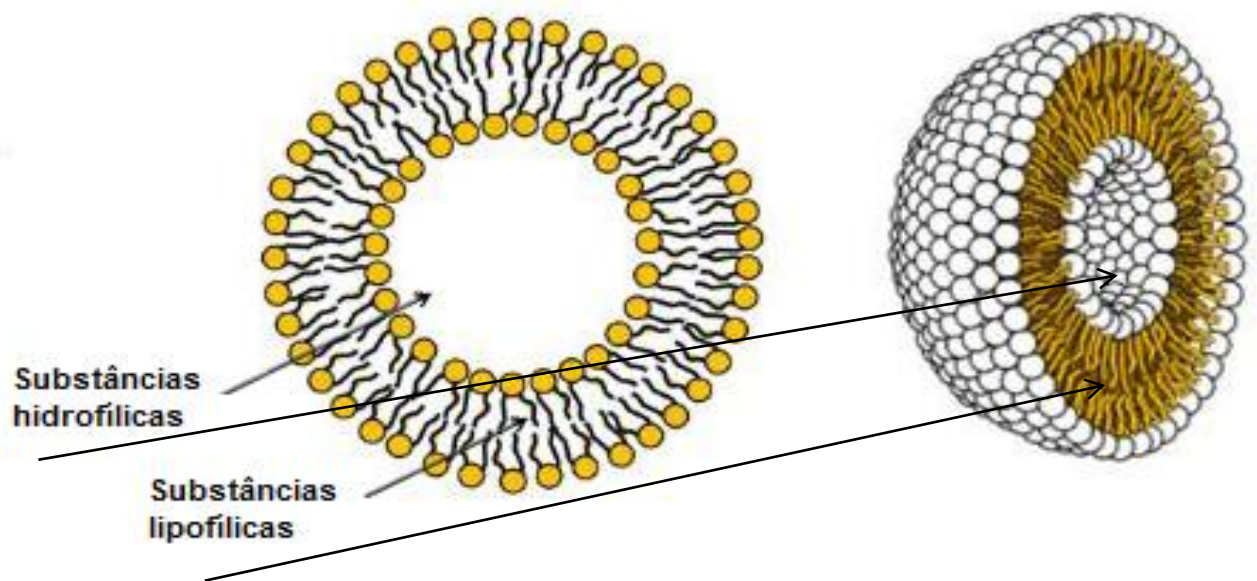
De uma forma bem geral, podem ser obtidos a partir de qualquer substância anfifílica formadora de fase lamelar. Isso ocorre quando a parte hidrofóbica desta substância entra em contato com algum solvente polar. Para buscar o equilíbrio e recuperar sua estabilidade química, esta substância passa a se reorganizar em uma bicamada de modo a evitar que suas partes hidrofóbicas entrem em contato com o dado solvente.

Devido às suas propriedades anfifílicas, os lipossomas podem incorporar tanto substâncias hidrofílicas como lipofílicas, sendo que as primeiras ficam no compartimento aquoso e as lipofílicas inseridas ou adsorvidas nas lamelas (CEVC et al., 2002; CEVC, 2004; EL MAGHRABY et al., 2008) (Figura 3).

Além disso, são sistemas altamente versáteis, pois suas propriedades físicas e químicas podem ser alteradas de acordo com requisitos farmacêuticos e farmacológicos, de modo a permitir o direcionamento específico e a liberação progressiva e controlada de um fármaco encapsulado (EDWARDS; BAEUMNER,

2006). Devido a esta versatilidade estrutural, os lipossomas se tornaram potentes carreadores para vários tipos de terapias, aumentando a eficácia em relação a outras formas farmacêuticas e reduzindo os efeitos tóxicos dos fármacos (BATISTA, et al., 2007).

Figura 3 - Esquema de um lipossoma e os locais de incorporação de substâncias



Fonte: Modificado de <http://www.reemazeineldin.com/Liposome.html>

Nas últimas décadas tem-se presenciado uma verdadeira revolução no emprego de lipossomas nas áreas de farmacologia, biotecnologia e medicina, conduzindo a produtos de uso clínico e veterinário, além de outras inúmeras novas aplicações (SANTOS; CASTANHO, 2002). Os lipossomas são muito utilizados para prolongar o tempo de permanência dos fármacos no organismo, além de garantir maior estabilidade e eficácia destes compostos (CEVC; BLUME; 1992).

Dentre as principais funções deste material de escala nanométrica, destaca-se sua capacidade de aumentar a permeabilidade e o efeito de retenção do material encapsulado (SANTOS; CASTANHO, 2002; ZUCKER et al., 2009; ELOY et al., 2014).

Neste contexto, peptídeos biologicamente ativos, especialmente os inibidores de topoisomerasas, encapsulados em lipossomas desenvolvidos com formulação

adequada, além de estarem protegidos da ação de proteases quando em meio biológico, poderia superar a baixa permeabilidade da membrana bacteriana, entrando na célula por rotas endocíticas ou por processos fusogênicos, facilitando desta forma, a acessibilidade destes peptídeos ao seu alvo intracelular.

1.4 Ramnolipídeos

Tensoativos são moléculas anfipáticas com uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica, podendo ser sintéticos, obtidos a partir de sínteses químicas, ou naturais, produzidos por microrganismos (biosurfactantes).

Os biotensoativos constituem uma classe de compostos tensoativos que são produzidos a partir de organismos vivos, podendo ser encontrados em superfícies de células microbianas ou excretados extracelularmente (SOUSA et al., 2014).

Estes compostos são alternativos aos tensoativos sintéticos, apresentando inúmeras vantagens especiais em relação a estes, como biodegradabilidade, baixa toxicidade, maior taxa de redução de tensão superficial, solubilidade em água alcalina, estabilidade térmica, estabilidade quanto a valores extremos de pH, produção a partir de substratos renováveis e a capacidade de modificação estrutural através da engenharia genética ou técnicas bioquímicas (BANAT et al., 2000).

Para a indústria, estes materiais têm propriedades interessantes como capacidade emulsificante, espumante e umectante e apresentam uma alternativa promissora e interessante do ponto de vista ambiental (LOVAGLIO et al., 2011a; SOUSA et. al., 2014).

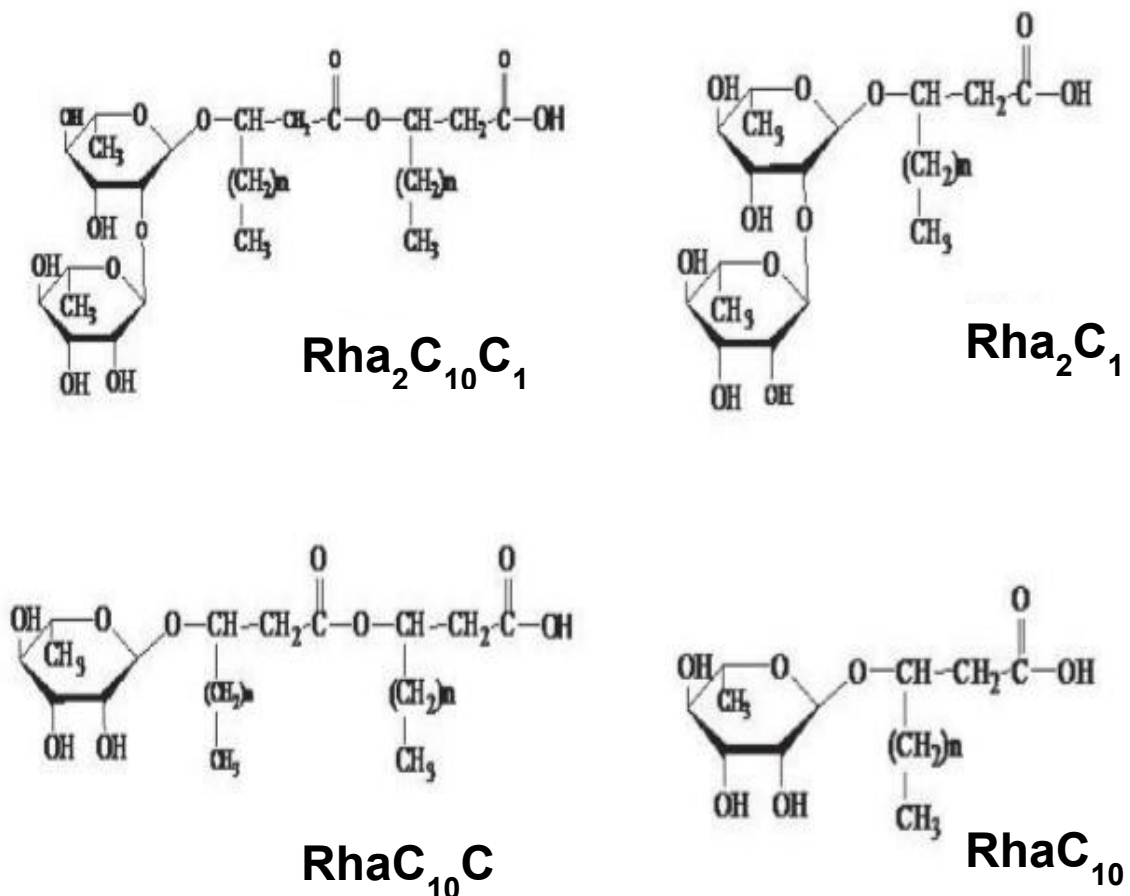
Os biotensoativos são capazes de formar diversas estruturas tais como micelas, vesículas esféricas ou irregulares, estruturas lamelares, entre outras (CHAMPION et. al., 1995).

Os principais tipos de tensoativos podem ser divididos em glicolipídios, fosfolipídios, lipossacarídeos, lipopeptídios, ácidos graxos e lipídios neutros (BOGNOLO, 1999; MULLIGAN et al., 2001). Os glicolipídios são definidos como hidróxi-ácidos graxos ligados a uma molécula de açúcar através de uma ligação glicosídica, enquadrando nessa classe somente os ramnolipídeos (HOLMBERG, 2001).

Os ramnolipídeos são um dos mais importantes representantes da classe de biotensoativos produzidos por microrganismos (HABA et al., 2014), fazem parte da família dos glicolipídeos, não apresentam fosfato na sua composição química e são mais frequentemente produzidos por processos fermentativos de *Pseudomonas aeruginosa*.

Pseudomonas aeruginosa é uma linhagem bem estudada e produtora, principalmente, de monoramnolipídeos do tipo Rha-C₁₀ e Rha-C₁₀-C₁₀ e diramnolipídeos do tipo Rha₂-C₁₀ e Rha₂-C₁₀-C₁₀ (LANG; WAGNER, 1987) (Figura 4).

Figura 4 - Estrutura dos quatro principais ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*



Fonte: LANG; WAGNER, (1987) modificado

Estes biotensoativos apresentam crescente interesse por parte da comunidade científica devido às suas propriedades físico-químicas e tensoativas

que lhes conferem um amplo espectro de aplicação, incluindo áreas como a biorremediação, recuperação terciária do petróleo, aditivos em alimentos, fármacos (antimicóticos e antibióticos), medicina, produtos de limpeza e cosméticos. (HENKEL, et al., 2012).

No caso da medicina, acredita-se que os ramnolipídeos provocam dificuldade à formação posterior de filmes bacterianos gerados por *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enteritidis*, que são patógenos, normalmente associados a alimentos. Segundo Gomes e Nitschke (2012), tais metabólitos se mostraram eficazes contra uma ampla gama de microrganismos, sendo eficientes contra bactérias Gram negativas e positivas, além de fungos filamentosos, porém não apresentam efeito significativo contra leveduras (VATSA et al., 2010).

Os ramnolipídeos ainda são pouco aproveitados e estudados para fins nanotecnológicos, no entanto, literatura aponta uma patente relacionada ao uso dos ramnolipídeos e sua aplicação como lipossoma (ISHIGAMI et al., 1990), além de outros trabalhos mais recentemente disponibilizados onde se utiliza das características do glicolipídeo para produção e caracterização de vesículas (PORNUNTHORNTAWEE et al., 2009; PORNUNTHORNTAWEE et al., 2011), ou ainda, onde se descreve que este biotensioativo apresenta características robustas o suficiente para ser aplicado para fins nanotecnológicos (MAIER; CHAVÉZ, 2000; LOURITH; KANLAYAVATTANAKUL, 2009; GUDIÑA et al., 2013).

O ramnolipídeo ainda vem sendo estudado para outras aplicações nanotecnológicas, onde se destacam: emulsão, microemulsão, e mais recentemente para nanoemulsão (BAI; MCCLEMENTS, 2016; NITSCHKE; SILVA, 2018) visando aplicações na indústria alimentícia, farmacêutica e agrícola.

Neste contexto, acredita-se que a utilização de ramnolipídeos para a produção de lipossomas juntamente com a incorporação de peptídeos inibidores de topoisomerasas seja uma ideia interessante, inovadora e capaz de conciliar as atividades de ambos (ramnolipídeo e peptídeo) de maneira sinérgica, a fim de aproveitar o potencial biotecnológico das duas moléculas, aplicando-as para o combate às infecções bacterianas.

5. CONCLUSÕES

- Os métodos desenvolvidos para a síntese, purificação, análise e caracterização de ParELC3 e seus derivados marcados, foram adequados e permitiram a obtenção dos peptídeos em boas quantidades e qualidade para a execução de todos os experimentos deste trabalho;
- Lipossomas constituídos de ramnolipídeos foram desenvolvidos em diferentes formulações e foram capazes de internalizar eficientemente o peptídeo ParELC3;
- Diferentemente da forma livres, ParELC3 encapsulado em lipossomas de ramnolipídeo mostrou inibição de crescimento das bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*;
- A liberação do peptídeo ParELC3 foi mais prolongada em lipossomas contendo fosfatidilcolina nas suas formulações;
- A estabilidade dos lipossomas foram em média de 15 a 20 dias, suficiente para testes cumulativos, o que os tornaria susceptíveis à aceitabilidade de indústrias farmacêuticas;
- Lipossomas constituídos majoritariamente de ramnolipídeos, contendo ParELC3 incorporados, não apresentam citotoxicidade;
- O presente trabalho contribui para demonstrar a interação positiva e o efeito sinérgico entre ramnolipídeos e peptídeos inibidores de DNA topoisomerasas;

6. REFERÊNCIAS

- AMBLARD, M.; FEHRENTZ, J.-A.; MARTINEZ, J.; SUBRA, G. Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis. **Mol. Biotechnol.** v. 33, n.3, p. 239-254, 2006.
- BAI, L.; MCCLEMENTS, D. J. Formation and stabilization of nanoemulsions using biosurfactants: Rhamnolipids. **Journal of colloid and interface science**, v. 479, p. 71-79, 2016.
- BANAT, I.M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 53, n. 5, p. 495-508, 2000.
- BARBOSA, L. C. B.; CANGUSSU, S. R. R.; GARRIDO, S. S.; MARCHETTO, R. Toxin-antitoxin systems and its biotechnological applications. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 13, p. 11-17, 2014.
- BARBOSA, L.C.B. **Peptídeos derivados da toxina ParE: síntese, estrutura e ação inibitória sobre a atividade de topoisomerases.** 2012. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual de São Paulo, Araraquara.
- BARBOSA, L.C.B.; GARRIDO, S.S.; GARCIA, A.; DELFINO, D.B.; SANTOS, L.N.; MARCHETTO, R. Design and synthesis of peptides from bacterial ParE toxin as inhibitors of topoisomerases. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 54, p. 591 -596, 2012.
- BATISTA, C.M.; CARVALHO, C.M.B.; MAGALHÃES, N.S.S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Braz. J. Pharm. Sc.**, v.43, n.2, p.167-179, 2007.
- BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces**, v. 152, p. 41-52, 1999.
- BREUKINK, E.; VANKRAAIJ, C.; DEMEL, R. A.; SIEZEN, R. J.; KUIPERS, O. P.; DEKRUIJFF, B. The C-terminal region of nisin is responsible for the initial interaction of nisin with the target membrane. **Biochemistry**, v. 36, n. 23, p. 6968-6976, 1997.
- BUSTAMANTE, P.; IREDELL, J. R. Carriage of type II toxin-antitoxin systems by the growing group of IncX plasmids. **Plasmid**, v. 91, p. 19-27, 2017.
- BUTS, L.; LAH, J.; DAO-THI, M. H.; WYNS, L.; LORIS, R. Toxin-antitoxin modules as bacterial metabolic stress managers. **Trends Biochem. Sci.**, v. 30, p. 672-679, 2005.
- CEVC, G. Transdermal drug delivery of insulin with ultradeformable carriers. **Clinical Pharmacokinetics**, v.56, n.5, p.675-711, 2004.
- CEVC, G.; BLUME, G. Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1104, p. 226-232, 1992.
- CEVC, G.; SCHATZLEIN, A.; RICHARDSEN, H. Ultradeformable lipid vesicles can penetrate the skin and other semi-permeable barriers unfragmented. Evidence from double label CLSM experiments and direct size measurements. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1564, p.21-30, 2002.
- CHAN, W. C.; WHITE, P. D. **Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: a Practical Approach**, New York, Oxford University Press, 2000.

CHAMPION, J. T.; GILKEY, J. C.; LAMPARSKI, H.; RETTERER, J.; MILLER, R. M. Electron microscopy of rhamnolipid (biosurfactant) morphology: effects of pH, cadmium and octadecane. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 170, p. 569-574, 1995.

CHO, N.J., HWANG, L.Y., SOLANDT, J.J.R, FRANK, C.W. Comparison of extruded and sonicated vesicles for planar bilayer self-assembly. **Materials**, v. 6, n. 8, p. 3294-3308, 2013.

CLSI. **Manual Clinical and Laboratory Standards Institute**. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standards- 6th ed. Document M7-A6 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2006.

COSTA, S.G.V.A.O.; NITSCHKE, M.; HADAD, R.; EBERLIN, M.N.; CONTIERO, J. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 483-488, 2006.

COUTURIER, M.; BAHASSE, E.M.; MELDEREN, L. V. Bacterial death by DNA gyrase poisoning. **Trends in Microbiology**, v. 6, n. 7, 1998.

CUDIC, M.; CONDIE, B.A.; WIENER,D.J.; LYSENKO, E.S.; XIANG, Z.Q.; BULET, P.; OTVOS Jr, L. Development of novel antibacterial peptides that kill resistant isolates. **Peptides**, v.23, p.2071-2083, 2002.

CUNHA, B. A. Antibiotic resistance. **Drugs Today**, v. 34, n. 8, p. 691-698, 1998.

EDWARDS, K. A.; BAEUMNER, A. J. Liposomes in analyses. **Talanta**, v. 68, n.5, p.1432-1441, 2006.

EL MAGHRABY, G.M.; BARRY, B.W.; WILLIAMS, A.C. Liposomes and skin: from drug delivery to model membranes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.34, n.4-5, p.203-222, 2008;

ELOY, J.O., PETRILLI, R., CHESCA, D.L., SAGGIORO, F.P., LEE, R.J., MARCHETTI, J.M. Anti-HER2 immunoliposomes for co-delivery of paclitaxel and rapamycin for breast cancer therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 115, p. 159-167, 2017.

ELOY, J. O., PETRILLI, R., TOPAN, J. F., ANTONIO, H. M. R., BARCELLOS, J. P. A., CHESCA, D. L.,...MARCHETTI, J. M. Co-loaded paclitaxel/rapamycin liposomes: Development, characterization and in vitro and in vivo evaluation for breast cancer therapy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.141, p.74-82, 2016.

ELOY, J. O.; SOUZA de, M.C.; PETRILLI, R.; BARCELLOS, J.P.A; LEE, R.J.; MARCHETTI, J.M. Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: strategies to enhance encapsulation and delivery. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, v. 123, p. 345-363, 2014.

FAIR, R. J.; TOR, Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. **Perspect. Medicine Chemicals**, v. 6, p. 25-64, 2014.

FARKUH, L. **Estudo e desenvolvimento de lipossomas com potencial para aplicação em base cosmética**. 2016. Dissertação(Mestrado em Química). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos.

FERNANDES, T.C.C. **Investigação dos efeitos tóxicos do biossurfactante ramnolípido e suas implicações quando usado na biorremediação de águas contaminadas por petróleo**. 2011. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Biologia Celular e Molecular) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D.A.; ROCHA, O,G,F.; DEMICHELI, C. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Quim Nova**, v. 3, p. 511-518, 2005.

FU, X.; HUCK, D.; MAKEIN, L.; ARMSTRONG, B.; WILLEN, U.; FREEMAN,T. Effect of particle shape and size on flow properties of lactose powders. **Particuology**, v. 10, n. 2, p. 203-208, 2012;

GARRIDO, S.S. **Novos inibidores peptídicos de topoisomerasas bacterianas estruturalmente derivados da proteína CcdB**. 2007. Tese (Doutorado em Biotecnologia). - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara;

GELLERT, M.; MIZUUCHI, K.; O'DEA, M. H.; NASH, H. DNA Gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 73, n. 11, p. 3872-3876, 1976.

GERALDO, V. P. N. **Filmes nanoestruturados contendo lipossomos para liberação controlada do Ibuprofeno**. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais), Universidade de São Paulo, São Carlos.

GLUKHOV, E., STARK, M., BURROWS, L. L., CHARLES, M. D. Basis of selectivity of cationic antimicrobial peptides for bacterial versus mammalian membranes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 40, p. 33960-33967, 2005.

GOMES, M.Z.V.G., NITSCHKE, M. Evaluations of rhamnolipid and surfactin to reduce the adhesion and remove biofilms of individual and mixed cultures of food pathogenic bacteria. **Food Control**, v. 25, n. 2, p.441–447, 2012.

GREGORIADIS, G., DAVIS, C. Stability of liposomes *in vivo* and *in vitro* is promoted by their cholesterol content and the presence of blood cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 89, n. 4, p. 1287-1293, 1979.

GUDIÑA, E.J., RANGARAJANV., SEN, R., RODRIGUES, L.R. Potential therapeutic applications of biosurfactants. **Trends in pharmacological sciences**, v. 34, n.12, p.667-675, 2013.

GUDIÑA, E.J.; ROCHA, V.; TEIXEIRA, J.A.; RODRIGUES, L.R. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *Paracasei* A20. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 419-424, 2010.

HABA, E.; PINAZO, A.; PONS, R.; PÉREZ, L.; MANRESA, A. Complex rhamnolipid mixture characterization and its influence on DPPC bilayer organization. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1838, n. 3, p. 776-783, 2014.

HANCOCK,R.E.; SAHL, H.G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nat Biotechnol**. p. 1551– 155, 2006.

HAYES, F. Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. **Science**, v. 301, p. 1496-1499, 2003.

HELVACI, S. S., PEKER, S., ÖZDEMİR, G. Effect of electrolytes on the surface behavior of rhamnolipids R1 and R2. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 35, p.225-23, 2004.

HENKEL, M.; MÜLLER, M. M.; KÜGLER, J. H.; LOVAGLIO, R. B.; CONTIERO, J.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: concepts for next-generation rhamnolipid production. **Process Biochem.** v. 47, p.1207-1219, 2012.

HOLMBERG, K. Natural surfactants. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.. 6, p. 148-159, 2001.

HONARY, S., ZAHIR, F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 2). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v,12, p.265-273, 2013.

INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA. **Combating Antimicrobial Resistance: Policy Recommendations to Save Lives.** Clinical Infectious Diseases, v. 52, n. suppl 5, p. S 397-S428, 2011.

ISAILOVIĆ, B. D., KOSTIĆ, I.T., ZVONAR, A., DORDEVIC´, V.B., GASPERLIN, M., NEDOVIC´, V.A., BUGARSKI, B.M. Resveratrol loaded liposomes produced by different techniques. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 19, p. 181-189, 2013.

ISHIGAMI, Y., GAMA, Y., NAGAHORA, H., HONGU, T., YAMAGUCHI, M. (1990). **Rhamnolipid Liposome.** U.S. Patent No. 4,902,512. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

JIANG, Y.; POGLIANO, J.; HELINSKI, D. R.; KONIECZNY, I. ParE toxin encoded by the broad- host- range plasmid RK2 is na innibitor of *Escherichia coli* gyrase. **Mol Mibrobiol** v. 44, n.4, p.971-979, 2002.

JOHNSON, E.P., STROM, A.R., KELINSKI, D.R Plasmid RK2 toxin protein ParE: purification and interaction with the ParD antitoxin protein. **Journal or Bacteriology**, v.178, p.1420-1429, 1996.

KUUPPO-LEINIKKI, P. Protozoan grazing on planktonic bacteria and its impact on bacterial population. **Marine Ecology Progress Series**, p. 227-238, 1990.

KAISER, E.; COLESCOTT, R.L.; BOSSINGER, C.D.; COOK, P.I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. **Analytical Biochemistry**, v.34 n.2 1970.

KAPLAN, W.; WIRTZ, V.; MANTEL, A.; STOLK,P.; DUTHEY, B.; LAING, R. **Priority Medicines for Europe and the World** 2013 Update. **Methodology**, v. 2, p. 7, 2013.

KATO, J.; NISHIMURA, Y.; IMAMURA, R.; NIKI, H.; HIRAGA, S.; SUZUKI, H. New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. **Cell**, v. 63, n. 2, p. 393-404, 1990.

KATO, J.I.; SUZUKI, H.; IKEDA, H. Purification and characterization of DNA topoisomerase IV in *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p.25676-25684, 1992.

KHAN, N. A.; SIDDIQUI, R. War on terror cells: killing the host that harbours 'superbugs' is an infection control strategy in our fight against infectious diseases. **Pathology Global Health**, v. 108, n. 1, p. 4-10, 2014.

KUNTSCHE, J.; HORST, J.C.; BUNJES, H. Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) for studying the morphology of colloidal drug delivery systems. v. 417, n. 1-2, p. 120-137, 2011.

LANG, S.; WAGNER, F. Structure and properties of biosurfactants, In: KOSARIC, N.; CAIRNS, W. L.; GRAY, N.C.C. (ed), *Biosurfactants and Biotechnology*. New York: Marcel Dekker, 1987.

LAPINSKI, M. M., CASTRO-FORERO, A., GREINER, A.J., OFOLI, R.Y., BLANCHARD, G.J. Comparison of liposomes formed by sonication and extrusion: rotational and translational diffusion of an embedded chromophore. **Langmuir**, v. 23, p. 11667 – 11683, 2007.

LEVINE, C.; HIASA, H.; MARIANS, K. J. DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1400, p. 29-43, 1998.

LOHNER, K.; STAUDEGGER, E. Are we on the threshold of the post-antibiotic era? In: LOHNER, K. (Ed.). *Development of novel antimicrobial agents: emerging strategies*. Wymondham: Horizon Scientific Press, p. 149-16. 2001.

LOVAGLIO, R.B.; SANTOS, F.J.; JAFELICCI JUNIOR, M.; CONTIERO, J. Rhamnolipid emulsifying activity and emulsion stability: pH rules. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, p. 301–305, 2011.

LOVAGLIO, R.B. **Produção de ramnolipídeos por mutantes de Pseudomonas aeruginosa LBI**. 2011. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

LOVAGLIO, R.B.; SANTOS, F.J.; JAFELICCI JUNIOR, M.; CONTIERO, J. Rhamnolipid emulsifying activity and emulsion stability: pH rules. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, p. 301–305, 2011a.

LORÉNZON, E. N. **Efeitos da dimerização na estrutura e atividade biológica dos peptídeos antimicrobianos Aureínas 1.2 e Magainina 2**. 2015. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

LOURITH, N., KANLAYAVATTANAKUL, M. Natural surfactants used in cosmetics: glycolipids. **International Journal of Cosmetic Science**, v.31, n.4, p.255-261, 2009.

LUEPKE, K.H., SUDA, K.J., BOUCHER, H., RUSSO, R.L., BONNEY, M.W., HUNT, T.D., MOHR, J. F. Past, present and future of antibacterial economics: increasing bacterial resistance, limited antibiotic pipeline, and societal implications. **Pharmacotherapy**, v. 37, n.1, 2017.

MAJER, B. J.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; DARROUDI, F.; LAKY, B.; WITK.; KNASMÜLLER, S. Genotoxic effects of dietary and lifestyle related carcinogens in 161 human derived hepatoma (HepG2, Hep3B) cells. **Mutation Research**, v. 551, p. 153 - 166, 2004.

MALVERN INSTRUMENTS. **Zetasizer nano series user manual**. Worcestershire, 2004. 269 p. Disponível em: <<http://www.malvern.com/en/>>. Acesso em: 2017.

MARTÍNEZ, J. L. Natural antibiotic resistance and contamination by antibiotic resistance determinants: the two ages in the evolution of resistance to antimicrobials. **Front. Microbiol.**, v. 3, 2012.

MARTÍNEZ, J. L.; BAQUERO, F. Emergence and spread of antibiotic resistance: setting a parameter space. **Ups. J. Med. Sci.**, v. 119, n. 2, p. 68-77, 2014.

MARTINS, S., SARMENTO, B., FERREIRA, D. C., & SOUTO, E. B. Lipid-based colloidal carriers for peptide and protein delivery – liposomes versus lipid nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 2, n.4, p. 595–607, 2007;

MASUDA, H.; INOUE, M. Toxins of Prokaryotic Toxin-Antitoxin Systems with Sequence-Specific Endoribonuclease Activity. **Toxins**, v. 9, n. 4, p. 140, 2017.

MAXWELL, A. DNA gyrase as a drug target. **Trends In Microbiol.**, v. 5, 1997.

MAIER, R. M.; SOBERON-CHAVEZ, G. Pseudomonas aeruginosa rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, n. 5, p. 625-633, 2000.

MOHAN, A.; MCCLEMENTS, D. J.; UDENIGWE, C. C. Encapsulation of bioactive whey peptides in soy lecithin-derived nanoliposomes: influence of peptide molecular weight. **Food Chemistry**, v. 213, p. 143-148, 2016.

MORAIS, H. A.; BARBOSA, C.M.S.; DELVIVO, F.M.; MANSUR, H.S.; OLIVEIRA, M.C.; SILVESTRE, M.P.C. Comparative study of microencapsulation of casein hydrolysates in lipospheres and liposomes. **Journal of food biochemistry**, v. 28, n. 1, p. 21-41, 2004.

MOUSSA, Z.; CHEBL, M.; PATRA, D. Interaction of curcumin with 1, 2-dioctadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocoline liposomes: Intercalation of rhamnolipids enhances membrane fluidity, permeability and stability of drug molecule. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, n149, p.30-37, 2017.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Engineering Geology**. v. 60, p. 371-380, 2001.

NITSCHKE, M.; SILVA, S. S. Recent food applications of microbial surfactants. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 58, n. 4, p. 631-638, 2018.

O' NEIL, J. Review on Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. **Rev Antimicrob Resist**, 2014.

PAGE, R.; PETI, W. Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. **Nat. Chem. Biol.**, v. 12, n. 4, p. 208-214, 2016.

PALMEIRA, T. F. dos S. **Interacção de uma série homóloga de anfífilas fluorescentes com bicamadas lipídicas na fase líquido ordenado**. 2012. Dissertação (Mestrado em Química Avançada e Industrial) – Universidade de Coimbra.

PANDEY, D. P.; GERDES, K. Toxin–antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. **Nucleic Acids Res.**, v. 33, n. 3, 2005.

PENG, H.; MARIANS, K.J. The interaction of Escherichia coli topoisomerase IV with DNA. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p.252286-25290, 1995.

PFALLER, M. A., SHEEHAN, D.J., REX. J. H., Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization. **Clin. Microbiol. Rev.**, 17, pp. 268–280, 2004.

PIAZZA, R.D. **Modificação da superfície de óxidos de ferro por dextrana derivatizada para aplicações em liberação de fármaco.** 2014. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

PORNSUNTHORNTAWEE, O., CHABADEJ, S., RUJIRAVANIT, R. Solution properties and vesicle formation of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 72, p. 6-15, 2009.

PORNSUNTHORNTAWEE, O.; CHAVADEJ, S.; RUJIRAVANIT, R. Characterization and encapsulation efficiency of rhamnolipid vesicles with cholesterol addition. **Journal of Biosc. and Bioeng.**, v. 112, n. 1, p. 102-106, 2011.

PRADO, A.H., RIGON, R.B., CHORILLI, M. Desenvolvimento e caracterização de carreadores lipídicos nanoestruturados para incorporação de p-metoxicinamato de octila. **Rev. Ciênc Farm Básica Apl.**, v. 36 Supl. 1., 2015.

ROBERT, M.; MERCADÉ, E.; BOSH, M. P.; PARRA, J. L.; ESPUNY, M. J.; MANRESA, M. A.; GUINEA, J. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. **Biotechnology Letters**, v.1, p.871 - 874, 1989.

SANCHÉZ, M.; TERUEL, J.A., ESPUNY, M.J., MARQUÉS, A., ARANDA, F.J., MANRESA, A., ORTIZ, A. Modulation of the physical properties of the laidoylphosphatidylethanolamine membranes by dirhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Chem. Phys. Lipids** 142, 118-127, 2006.

SANTOS, N. C., CASTANHO, M. A.B. Liposomes: has the magic bullet hit the target?. **Química nova**, v. 25, n. 6B, p. 1181-1185, 2002.

SCHIAVONE, N.; DONINI, M.; NICOLIN, A.; CAPACCIOLLI, S. Antisense; oligonucleotide drug design. **Curr Pharm Des** 10:769–784, 2004.

SCHWARZ, C.; MEHNERT, W.; LUCKS, J. S.; MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization. **Journal of Controlled Release**, v. 30, p. 83-96, 1994.

SEGURA-GARCÍA, J. M., GAVILANES, J. G., MARTÍNEZ DEL POZO, A., MONTERO, F., OÑADERO, M., VIVARCO, F. **Técnicas instrumentales de análisis en Bioquímica.** Capítulo 2, Espectroscopía de absorción ultravioleta-visible. Editorial Sintesis. 1999.

SHARMA, A; SHARMA, U S. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. **International journal of pharmaceutics**, v. 154, n. 2, p. 123-140, 1999.

SHIN-ICHIRO, M., MIZUTANI, Y., KURITA, K., WATANABE, A., AKIYOSHI, K. Changes in the morphology of cell-size liposomes in the presence of cholesterol: formation of neuron-like tubes and liposome networks. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1669, n. 2, p. 164-169, 2005.

SILVA da, V.L. **Desenvolvimento de estratégias de alimentação para produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* LBI SA1 em biorreator**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

SOBERÓN-CHÁVEZ, G., LÉPINE, F., DÉZIEL, E. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 68, n. 6, p. 718-725, 2005.

SOUSA, J.R.; CORREIA, J.A.C.; MELO, V.M.M.; GONÇALVES, L.R.B.; CRUZ, A.J.G. Cinética e caracterização de ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* MSIC02 utilizando glicerol como fonte de carbono. **Quím. Nova**, v. 37, n. 3, p. 431-441, 2014.

STEWART, J. M.; YOUNG, J. D. *In*: MERRIFIELD, R. B. (Ed.) **Solid Phase Peptide Synthesis**, New York: Pierce Chemical Company, 2ª Ed., 1984.

TAMAI, N., UEMURA, M., GOTO, G., MATSUKI, H., KANESHIN, S. Lateral phase separation in cholesterol-diheptadecanoylphosphatidylcholine binary bilayer membrane. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.65, p.213-218, 2008.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 964 p.

TROVATTI, E.; COTRIM, C. C.; GARRIDO, S. S.; BARROS, R. S.; MARCHETTO, R. Peptides based on CcdB protein as novel inhibitors of bacterial topoisomerases. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 18, p. 6161-6164, 2008.

VATSA, P.; SANCHEZ, L.; CLEMENT, C.; BAILLEIEUL, F.; DOREY, S. Rhamnolipid Biosurfactants as new players in animal and plant defense against microbes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 12, p.5095-5108, 2010.

WANG, J. C. DNA topoisomerases. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 54, p. 665-697, 1985.

WANG, X.; WOOD, T. K. Toxin-antitoxin systems influence biofilm and persister cell formation and the general stress response. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 16, p. 5577-5583, 2011.

WILBAUX, M.; MINE, N.; GUEROUT, A. M.; MAZEL, D.; VAN MELDEREN, L.; Functional interactions between coexisting toxin-antitoxin systems of the ccd family in *Escherichia coli* O157:H7. **J. Bacteriology**, v. 189, n. 7, p. 2712 - 2719, 2007.

YAMAGUCHI, Y., INOUE, M. Regulation of growth and death in *Escherichia coli* by toxin-antitoxin systems. **Nat. Rev. Microbiol.**, v.9, n.11, p.779-790, 2011.

YEAGLE, P.L. The roles of cholesterol in the biology cells, in: YEAGLE, P.L (Ed), **The structure of biological membrane**, 2ª Edição, CRC Press, Londres, 2005.

ZAMARION, V. **Funcionalização de Nanopartículas Plasmônicas para o Desenvolvimento de Sensores SERS, Anexo: Espalhamento de Luz Dinâmico - Dynamic Light Scattering (DLS)**. Tese de doutorado, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2012.

ZHOU, Y., HOU, Z., FANG, C., XUE, X., DA, F., WANG, Y., BAI, H., LUO, X. Comparison of microplate and macrodilution methods in time-kill study of new antimicrobial drugs. **Folia Microbiol**, v. 58, p. 9-16, 2013.

ZUCKER, D., MARCUS, D., BARENHOLZ, Y., GOLDBLUM, A. Liposome drugs' loading efficiency: a working model based on loading conditions and drug's physicochemical properties. **Journal of Controlled Release**, v.139, n.1, p.73-80, 2009.