

UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

“Síntese e estudos de sistemas de bioencapsulação associados
a peptídeos antimicrobianos miméticos da toxina natural CcdB”

Isabelle Cavalini de Oliveira

Dissertação de Mestrado

2014



Isabelle Cavalini de Oliveira

“Síntese e estudos de sistemas de bioencapsulação associados a peptídeos antimicrobianos miméticos da toxina natural CcdB”

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

Orientador: Prof. Dr. Saulo Santesso Garrido

Araraquara

2014

DADOS CURRICULARES

Nome: Isabelle Cavalini de Oliveira

Nome em citações bibliográficas: OLIVEIRA, I.C.

Filiação: Luiz Fernando de Oliveira e Maria Claudia Cavalini Junqueira

Data de nascimento: 04/01/1989

Estado civil: solteira

Telefone: (16) 98247-0000

E-mail: isabellecavalini@gmail.com

Resumo das qualificações: Mestranda em Biotecnologia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP, na área de síntese de peptídeos com ênfase em sistema toxina-antitoxina e peptídeos antimicrobianos. Licenciada em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário Barão de Mauá (2012).

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2012 - 2014

Mestrado em Biotecnologia.

Universidade Estadual Paulista - Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Instituto de Química de Araraquara.

Título: "Síntese e estudos de sistemas de bioencapsulação associados a peptídeos antimicrobianos miméticos da toxina natural CcdB"

Orientador: Prof. Dr. Saulo Santesso Garrido

Bolsista FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

2008 - 2012

Licenciatura Plena em Ciências Biológicas - Centro Universitário de Barão de Mauá
– Ribeirão Preto - SP

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

- Instituto Agronômico de Campinas – IAC – Centro de Cana

Cargo: Estagiária de Iniciação Científica

2009 - “Comportamento *In Vitro* de Variedades de Cana-de-Açúcar IAC”

2010 - “Comportamento *In Vitro* de Genótipos de Cana- de-Açúcar IAC”

Descrição: Os Projetos estão relacionados com cultivo e o comportamento *in vitro* de genótipos de cana – de – açúcar IAC visando o melhoramento genético. Para a reprodução dos clones, foram utilizados discos foliares, meristema apical e a indução de calos embriogênicos. Além disso, a elaboração de relatórios, organização do laboratório de pesquisa e materiais fizeram parte do estágio.

Período: 04/06/2009 – 31/07/2011

- DAERP – Departamento de água e esgoto de Ribeirão Preto

Período: 10/02/2009 a 15/05/2009

Descrição: Palestras para escolas da rede pública relacionadas com o consumo apropriado e economia de água.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS

OLIVEIRA, I.C.; ZAMBOM, C.R; GARRIDO, S.S; Release and Encapsulation of Antimicrobial Peptides Structurally Derived from Toxin Ccdb In: **43rd Annual Meeting of SBBq, 2014**, Foz do Iguaçu.

OLIVEIRA, I.C.; ZAMBOM, C.R; PORTO, P.M; OLIVEIRA, A.G.F; GARRIDO, S.S; New peptides structurally based on CcdB toxin with inhibition potential of bacterial

topoisomerases In: **5th Symposium on Biological Chemistry, Health and Medicine: Frontier and New Perspectives, 2013**, Ilhabela.

OLIVEIRA, I.C.; ZAMBOM, C.R; GARRIDO, S.S; Synthesis and studies of bioencapsulation systems associated with antimicrobial peptides based on natural toxin CcdB In: **III International Symposium on Drug Discovery**, 2013, Araraquara.

GARRIDO, S.S; OLIVEIRA, I.C.; ZAMBOM, C.R; In vitro efficacy of cccb toxin peptide analogues mediated by drug delivery systems formulation In: **Chemistry for Life Science-5th European Conference**, 2013, Barcelona, Espanha.

OLIVEIRA, I. C.; MARTINS, A.P.B; FESTUCCI, C.S; SANSOLI, D.M; PINTO, L.R; CRESTE, S.A; Comportamento *in vitro* de genótipos de cana-de-açúcar IAC In: **5º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica-CIIC**, 2011, Campinas.

OLIVEIRA, I. C.; MARTINS, A.P.B; FESTUCCI, C.S; SANSOLI, D.M; PINTO, L.R; CRESTE, S.A; Comportamento *in vitro* de variedades de cana-de-açúcar IAC In: **4º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica-CIIC**, 2010, Campinas.

IDIOMAS

Inglês: Avançado

Espanhol: Básico

Dedico este trabalho com imenso carinho:

À Deus por guiar meus passos e me

amparar nos momentos de dificuldade

e por me fazer entender que cada situação vivida é um aprendizado.

**Aos meus pais, por todo amor e carinho,
por me mostrarem o certo e o errado e,
por entenderem as minhas escolhas e apoiá-las
e por me amarem incondicionalmente, cada um com seu jeitinho.**

**Aos meus tios Saulo e Celina,
por serem os meus maiores exemplos,
por serem mais do que tios,
e por serem o exemplo de família que um dia eu quero construir.
Por todo o aprendizado pessoal e profissional
e por todo amor, carinho e respeito que conquistamos juntos.**

**Ao meu namorado e melhor amigo Thiago
por estar sempre ao meu lado me apoiando e incentivando,
por me entender e me aconselhar,
por dar um brilho especial na minha vida e
fazer com que meus dias sejam melhores.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter estado sempre ao meu lado, iluminando o meu caminho, mesmo quando eu não percebia.

Aos meus pais, por terem me dado o dom da vida e me transformado na pessoa que hoje sou.

A minha avó Jacyra (Véia), que nos momentos que precisei sempre esteve ao meu lado, me recebendo de braços abertos.

Aos meus tios Celina e Saulo, que fizeram papel de pais durante minha estadia em Araraquara. A minha eterna gratidão por toda a preocupação, apoio e amor.

Ao meu namorado Thiago, pelo companheirismo, pelos momentos divididos, pelo amor e alegria que trouxe à minha vida.

Aos meus avós Elza e Rubens, por todo apoio e carinho.

Ao meu querido orientador e professor da vida Saulo Garrido pela oportunidade concedida, pela paciência e amizade.

Aos professores do departamento Reinaldo Marchetto e Eduardo Cilli, pelos conhecimentos passados.

Aos meus companheiros de laboratório e amigos Ana, Larissa, Edson (Araka), Rute, Grazielly, Matheus, Estéban, Paulo, Eduardo (lentilha), Júlia, Norival, Wanessa, Jéssica e em especial a Amanda e Larissa (Lari) por toda a ajuda quando precisei, pela convivência, alegrias e dificuldades compartilhadas.

Ao grupo de pesquisa Aline, Priscila, Alberto e em especial à Carol pelo acompanhamento inicial nos experimentos e a amizade.

Ao professor Marlus, por disponibilizar o laboratório.

Aos amigos que me acompanharam nessa jornada Marina (Máh), Vinícius, Marina, Juliana, Alfredo, Carol, João Vitor (Inácio), Catharine, Beatriz, Sérgio Guilherme (Prê). Pelos dias de diversão e descontração.

A seção de Pós-graduação, em especial à Célia, Wennia, Sandra e Paula por toda a atenção despendida.

Ao pessoal da biblioteca, em especial à Valéria, Cristina e Maria Isabel por toda a atenção e ajuda na confecção das referências.

Aos funcionários do Instituto de química Fátima, Sinélia, Luisa, Gaspar, Tarcísio e Rogério, por toda a disposição em ajudar.

Ao Instituto de Química por ter me acolhido e permitido a minha formação.

À FAPESP pela bolsa concedida.

**De tudo ficaram três coisas:
A certeza de que estamos começando,
A certeza de que é preciso continuar,
A certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar.
Façamos da interrupção um caminho novo,
Da queda, um passo de dança,
Do medo, uma escada,
Do sonho, uma ponte,
Da procura, um encontro.
(Fernando Sabino)**

**Tenha em mente que tudo que você aprende
na escola é trabalho de muitas gerações.**

**Tudo isso é posto em sua mão como sua herança
para que você receba-a, honre-a, acrescente a ela e,
um dia, fielmente, deposite-a nas mãos de seus filhos.**

(Albert Einstein)

RESUMO

O uso de novas tecnologias como, por exemplo, peptídeos sintéticos para o desenvolvimento de novas drogas é uma estratégia promissora no campo da biotecnologia. Peptídeos com efeito antimicrobiano derivados de toxinas bacterianas intracelulares, produzidas por sistemas de morte pós-segregacional (PKS) tais como CcdB são exemplos dessa estratégia. Resultados promissores têm sido obtidos em relação à inibição da atividade das enzimas bacterianas topoisomerase IV e DNA girase por derivados peptídicos de toxinas antimicrobianas, isto pode ser visto através de ensaios *in vitro*, como eletroforese em gel de agarose. Porém, drogas com estrutura peptídica derivadas de toxinas bacterianas apresentam sérios problemas na aplicação terapêutica, pois, têm baixa solubilidade e difícil permeabilidade em membranas bacterianas. Portanto, o objetivo desse estudo consiste no desenvolvimento e aprimoramento de sistemas nanoestruturados (lipossomas) que permita a encapsulação de análogos peptídicos da toxina CcdB e sua consequente translocação no citosol bacteriano, permitindo que os mesmos atinjam seus alvos celulares, que são as enzimas bacterianas DNA girase e Topoisomerase IV. Lipossomas do tipo SUV ("Small unilamellar vesicles") de 100 nm de diâmetro, foram preparados pela técnica de extrusão e evaporação variando-se a composição química de suas formulações. Desta forma, foi avaliada a eficiência de encapsulação dos peptídeos através de técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectroscopia de UV-Vis e fluorescência. Após testes de eficiência de encapsulação, os lipossomas contendo os análogos peptídicos da toxina CcdB encapsulados, foram submetidos a ensaio de inibição de crescimento em meio líquido para diferentes espécies bacterianas. Os resultados mostraram que os valores de eficiência para o análogo CdBSG-2 ficaram entre 62 e 75% e entre 52 e 71% para o análogo CcdBET-2. Os estudos de inibição de crescimento bacteriano mostraram que o sistema lipossomal é efetivo, permitindo uma inibição de até 82% da espécie gram positiva *Staphylococcus aureus* e 61% para a espécie gram negativa *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC). Este trabalho demonstrou que a utilização de sistemas nanoestruturados para promover a entrada desses peptídeos sintéticos no citosol bacteriano é de grande importância para viabilizar a aplicação desta classe de biomoléculas em estudos terapêuticos, permitindo assim, que tais peptídeos possam ser utilizados como antibióticos mais promissores, se

associados a sistemas eficientes de transporte e liberação controlada de moléculas peptídicas.

Palavras-chave: Peptídeos antimicrobianos, Toxina CcdB, DNA girase, Topoisomerase IV, lipossomas SUV.

ABSTRACT

The new technologies, like synthetic peptides, for the development new drugs is a promising in biotechnology. Peptides with antibiotic properties, from Intracellular toxins produced by systems of post-segregational killer (PSK) in bacteria such as CcdB are recent examples of this strategy. Promising results have been obtained with respect to inhibition of the activity of the bacterial enzyme DNA gyrase and topoisomerase IV by toxins antimicrobial peptide derivatives that can be seen through in vitro assays such as electrophoresis in agarose gel. However, drugs formed by peptide structures, based on bacterial toxins, have been shown serious problems in therapeutic application due to their poor solubility and low biological membrane permeabilization. The aim of this study is the development and enhancement of nanostructured systems (liposomes) that allows the encapsulation of analogues peptides based on CcdB toxin and its consequent bacterial translocation in the cytosol, allowing them to reach their cellular targets, which are bacterial enzymes DNA gyrase and topoisomerase IV. Liposomes of the SUV type ("Small unilamellar vesicles") of 100 nm diameter were prepared by extrusion and evaporation technique by varying the chemical composition of their formulations. Thus, we evaluated the encapsulation efficiency of the peptides through techniques of high performance liquid chromatography (HPLC) and UV-Vis spectroscopy and fluorescence. After efficiency of encapsulation tests the liposomes containing the peptides have been tested for growth inhibition in a liquid medium to different bacterial species. The results showed that the efficiency values for the analog CdBSG-2 were between 62 and 75% and the CcdBET-2 analogue values were between 52 and 71% Furthermore, the results of bacterial growth inhibition tests showed liposomal system that is effective, to inhibit 82% of gram positive *Staphylococcus aureus* and 61% of gram negative *Escherichia coli* (EHEC). This work demonstrated that the use of nanostructured materials for promoting the entry of these synthetic peptides in the bacterial cytosol is of great importance to enable the application of this class of biomolecules in therapeutic studies, thus allowing these peptides can be used as the most promising antibiotics where associated with efficient transport systems and controlled release of peptide molecules.

Keywords: Antimicrobial Peptides, CcdB toxin, DNA gyrase, Topoisomerase IV, liposomes SUV.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Sistema toxina/antitoxina.	28
Figura 2 - Topoisomerase Tipo I, faz a quebra de uma fita de DNA e Topoisomerase do Tipo II cliva ambas as fitas de DNA.....	29
Figura 3 - Número de ligações, Lk. Em (A) , Lk = 1, podemos observar apenas um ponto de ligação entre as duas fitas do DNA, enquanto que em (B) , observamos a existência de seis pontos de ligações entre as fitas, gerando um Lk = 6.	30
Figura 4 - DNA circular relaxado (A) , superenovelado (B) e sob ação de uma topoisomerase (C-D-E)	30
Figura 5 - Diagramas das regiões específicas presentes nas subunidades GyrA e GyrB da enzima DNA girase.	31
Figura 6 - Mecanismo de ação da DNA Girase.	33
Figura 7 - Mecanismo de ação da enzima topoisomerase I humana.	36
Figura 8 - Reação de transesterificação catalisada pela topoisomerase I.....	37
Figura 9 - Aminoácidos que compõem a toxina CcdB e a antitoxina CcdA.	40
Figura 10 - Em (A): Representação esquemática da estrutura proteica do CcdB. (B): Estruturas primárias dos peptídeos CcdBET-2 e CcdBSG-2. (Z = ε-amino hexanóico).....	41
Figura 11 - Representação esquemática de lipossomas. Em (A) modelo de lipossomas unilamelar e multilamelar. Em (B) mostrando a base de sua classificação em termos de tamanho, número de lamelas e sua posição relativa.....	43
Figura 12 - Protocolo utilizado para Síntese de Peptídeo em Fase Sólida (SPFS)..	51
Figura 13 - Reação dos aminos grupos livres dos aminoácidos com a ninidrina, produzindo um composto de coloração azul-violácea.....	52
Figura 14 - Estrutura da molécula de 5 (6) – Carboxifluoresceína acoplada na extremidade amino terminal dos análogos peptídicos.....	52
Figura 15 - Estrutura primária dos peptídeos com carboxifluoresceína (CF).	53
Figura 16 - Gráfico representativo da absorção de luz das formas oxidadas e não oxidadas da hemoglobina.....	59
Figura 17 - Esquema da síntese dos análogos peptídicos de CcdB.	62
Figura 18 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE, em escala analítica, para o análogo peptídico CcdBET-2, antes (A) e após purificação (B).	63

Figura 19 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE, em escala analítica, para o análogo peptídico CcdBSG-2, antes (A) e após purificação (B).....	64
Figura 20 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE, em escala analítica, para o análogo peptídico CcdBET-2-CF, antes (A) e após purificação (B).	64
Figura 21 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE, em escala analítica, para o análogo peptídico CcdBSG-2-CF, antes (A) e após purificação (B).....	65
Figura 22 - Curva de emissão de fluorescência para uma solução de concentração 100 μ M de CcdBET-2 livre (azul); solução contendo lipossomas com peptídeo livre (vermelho); solução contendo somente lipossomas com peptídeo encapsulado (verde).....	67
Figura 23 - Curva padrão obtida pela emissão máxima de fluorescência de soluções de CcdBET-2 em diferentes concentrações.....	68
Figura 24 - Curva padrão obtida pela emissão máxima de fluorescência de soluções de CcdBSG-2 em diferentes concentrações.	68
Figura 25 - Espectro de emissão de fluorescência das frações 11 e 12 após separação em coluna de gel filtração da formulação de lipossoma positiva(+). Comprimento de onda de excitação: 290 nm; Faixa de varredura de emissão de fluorescência: 300 - 500 nm.....	70
Figura 26 - Espectro de emissão de fluorescência das frações correspondentes a lipossomas de diferentes formulações contendo o peptídeo CcdBET-2 não encapsulado. Abaixo de cada espectro está a formulação correspondente e o valor máximo de emissão de fluorescência. Comprimento de onda de excitação: 290 nm; Faixa de varredura de emissão de fluorescência: 300 - 500 nm.....	71
Figura 27 - Inibição da atividade de superenovelamento da DNA girase pelo CcdBET-2. Volume de reação de 30 μ L contendo: (linha A) plasmídeo pBr322 relaxado controle; (linha B) plasmídeo pBr322 relaxado e DNA girase (1U) na ausência de inibidor; (linhas C) plasmídeo pBR322 relaxado, DNA girase (1U) e o análogo CcdBET-2. Os números 1, 2 e 3 correspondem às concentrações ensaiadas de 100, 50 e 25 μ mol/L.....	74
Figura 28 - Inibição da atividade de relaxamento da topoisomerase IV pelo CcdBET-2. Volume de reação de 30 μ L contendo: (linha A) plasmídeo pBr322 superenovelado controle; (linha B) plasmídeo pBr322 superenovelado e topoisomerase IV (1U) na ausência de inibidor; (linhas C) plasmídeo pBR322 superenovelado, topoisomerase IV (1U) e o análogo CcdBET-2. Os números 1, 2 e 3	

correspondem às concentrações ensaiadas de 100, 50 e 25 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente.74

Figura 29 - Inibição do superenovelamento do DNA pelo CcdBSG-2. Volume de reação 30 μL ; ensaios contendo plasmídeo pBR322 relaxado (0,5 μg) e girasse (1U). (coluna 1), pBR322 relaxado controle; (coluna 2) plasmídeo pBr322 relaxado e DNA girase (1U) na ausência de inibidor; (colunas 3-6), contendo o análogo CcdBSG-2 nas concentrações de 90, 30, 15 e 10 μM75

Figura 30 - Inibição da atividade de relaxamento da topoisomerase IV pelo CcdBSG-2. Volume de reação de 30 μL contendo: (linha -) plasmídeo pBr322 superenovelado controle; (linha +) plasmídeo pBr322 superenovelado e topoisomerase IV (1U) na ausência de inibidor; (linhas 1 e 2) plasmídeo pBR322 superenovelado, topoisomerase IV (1U) e o análogo CcdBSG-2 na concentração 15 $\mu\text{mol/L}$ - ensaio em duplicata.75

Figura 31 - Ensaio de inibição enzimática com o análogo CcdBSG-2 com carboxifluoresceína em topoisomerase IV . Em 1 tem-se o controle negativo, onde o plasmídeo encontra-se superenovelado, sem ação da topoisomerase IV; em 2 tem-se o controle positivo, onde o plasmídeo está sob ação da enzima; 3-7 tem-se o plasmídeo em contato com a enzima e CcdBSG-2 nas concentrações, 100 μM , 50 μM , 25 μM , 15 μM e 5 μM respectivamente.76

Figura 32 - Ensaio de inibição enzimática com o análogo CcdBET-2 com carboxifluoresceína em topoisomerase IV . Em 1 tem-se o controle negativo, onde o plasmídeo encontra-se superenovelado, sem ação da topoisomerase IV; em 2 tem-se o controle positivo, onde o plasmídeo está sob ação da enzima; 3-7 tem-se o plasmídeo em contato com a enzima e CcdBET-2 nas concentrações, 100 μM , 50 μM , 25 μM , 15 μM e 5 μM respectivamente.77

Figura 33 - Ensaio de inibição enzimática com o análogo CcdBSG-2 com carboxifluoresceína em DNA Girase. Em 1 tem-se o controle negativo, onde o plasmídeo encontra-se relaxado, sem ação DNA Girase; em 2 tem-se o controle positivo, onde o plasmídeo está sob ação da enzima; 3-7 tem-se o plasmídeo em contato com a enzima e CcdBSG-2 nas concentrações, 100 μM , 50 μM , 25 μM , 15 μM e 5 μM respectivamente.77

Figura 34 - Ensaio de inibição enzimática com o análogo CcdBET-2 com carboxifluoresceína em DNA Girase . Em 1 tem-se o controle negativo, onde o plasmídeo encontra-se Relaxado, sem ação DNA Girase; em 2 tem-se o controle

positivo, onde o plasmídeo está sob ação da enzima; **3-7** tem-se o plasmídeo em contato com a enzima e CcdBET-2 nas concentrações, 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 15 μ M e 5 μ M respectivamente.78

Figura 35 - Ensaio enzimático com o análogo CcdBET-2 em topoisomerase II α humana. Em **1** tem-se o controle negativo, onde o plasmídeo encontra-se superenovelado, sem ação da topoisomerase II α ; em **2** tem-se o controle positivo, onde o plasmídeo está sob ação da topoisomerase II α ; **3-7** tem-se o plasmídeo em contato com a enzima e CcdBET-2 nas concentrações 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 15 μ M e 5 μ M respectivamente.78

Figura 36 - Ensaio de inibição enzimática com o análogo CcdBSG-2 em topoisomerase II α humana. Em **1** tem-se o controle negativo, onde o plasmídeo encontra-se superenovelado, sem ação da topoisomerase II α ; em **2** tem-se o controle positivo, onde o plasmídeo está sob ação da topoisomerase II α ; **3-7** tem-se o plasmídeo em contato com a enzima e CcdBSG-2 nas concentrações, 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 15 μ M e 5 μ M respectivamente.79

Figura 37 - Ensaio de inibição enzimática com o análogo CcdBET-2 em topoisomerase I humana. Em **1** tem-se o controle negativo, onde o plasmídeo encontra-se superenovelado sem ação da topoisomerase I; em **2** tem-se o controle positivo, onde o plasmídeo está sob ação da topoisomerase I; **3-7** tem-se o plasmídeo em contato com a enzima e CcdBET-2 nas concentrações 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 15 μ M e 5 μ M respectivamente.80

Figura 38 - Ensaio de inibição enzimática com o análogo CcdBSG-2 em topoisomerase I humana. Em **1** tem-se o controle negativo, onde o plasmídeo encontra-se superenovelado sem ação da topoisomerase I; em **2** tem-se o controle positivo, onde o plasmídeo está sob ação da topoisomerase I; **3-7** tem-se o plasmídeo em contato com a enzima e CcdBSG-2 nas concentrações 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 15 μ M e 5 μ M respectivamente.80

Figura 39 - Resultados obtidos utilizando *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), cada agrupamento de barras representa um teste realizado com uma formulação de lipossoma encapsulada a um análogo.84

Figura 40 - Resultados dos testes utilizando *Staphylococcus aureus*, cada agrupamento de barras representa um teste realizado com uma formulação de lipossoma encapsulada a um análogo.85

Figura 41 - Ensaio de caracterização de lipossomas na ausência de peptídeo. (A) formulação Neutra apresentou tamanho médio de 104,3 nm; (B) formulação PEG apresentou tamanho médio de 120,6 nm; (C) formulação positiva (+) apresentou tamanho médio de 115,6 nm; (D) formulação positiva sem colesterol apresentou tamanho médio de 108,3 nm.....88

Figura 42 - Ensaio de caracterização de lipossomas contendo o peptídeo CcdBSG-2 encapsulado. (A) formulação Neutra apresentou tamanho médio de 120,1 nm; (B) formulação PEG apresentou tamanho médio de 141,5 nm; (C) formulação positiva (+) apresentou tamanho médio de 122,5 nm; (D) formulação positiva sem colesterol apresentou tamanho médio de 134,0 nm.....89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição lipídica dos lipossomas inicialmente utilizada nos estudos*.	56
Tabela 2 - Massas de peptidil-resinas de cada um dos análogos sintetizados.....	61
Tabela 3 - Massas moleculares teóricas e obtidas por espectrometria de massas dos análogos peptídicos sintetizados.....	65
Tabela 4 - Comparação dos resultados de eficiência de encapsulação obtidos para o peptídeo CcdBET-2 para as diferentes formulações de lipossomas.	72
Tabela 5 - Comparação dos resultados de eficiência de encapsulação obtidos para os peptídeos CcdBSG-2 e CcdBET-2 para as diferentes formulações de lipossomas.	72
Tabela 6 - Resultados do teste hemolítico para o análogo peptídico CcdBSG-2.....	81
Tabela 7 - Porcentagem de atividade hemolítica para diferentes concentrações de CcdBSG-2.	82
Tabela 8 - Resultados do teste hemolítico para o análogo peptídico CcdBET-2.	82
Tabela 9 - Porcentagem de atividade hemolítica para diferentes concentrações de CcdBET-2.....	83
Tabela 10 - Porcentagem de inibição do crescimento bacteriano, utilizando <i>Staphylococcus aureus</i>	86
Tabela 11 - Porcentagem de inibição do crescimento bacteriano, utilizando <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC).	86

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

ACN – Acetonitrila

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLME – Cromatografia Líquida de Média Eficiência

Chol - Colesterol

DCM – Diclorometano

DPPC – Dipalmitoilfosfatidilcolina de soja

DIC – Diisopropilcarbodiimida

DIEA – N-Diisopropiletilamina

DMF – Dimetilformamida

DMSO – Dimetilsulfóxido

EDT – 1,2-Etanoditiol

Fmoc – 9-Fluorenilmetiloxicarbonila

HOBt – N-Hidroxibenzotriazol

ESI-MS – Eletron Spray ionization-Mass spectrometry

MLV – Multilamellar Large Vesicles

PEG – Polietilenoglicol

PG – L- α - palmitoil glycerol

PSK – Morte pós-segregacioal

SA - Estearilamina

SUV – Small Unilamellar Vesicles

TA – Toxina/Antitoxina

TFA – Ácido Trifluoracético

TIS – Triisoproplisilano

UV-vis – Espectroscopia na região do Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	27
1.1. DNA topoisomerases	28
1.1.1. DNA girase	30
1.1.2. Topoisomerase IV	34
1.1.3. DNA Topoisomerase I humana	35
1.1.4. Topoisomerase II humana	38
1.2. A Toxina Natural CcdB	38
1.2.1. Análogos da Toxina Natural CcdB	40
1.3. Sistemas de liberação controlada de fármacos	42
1.4. Ensaios de viabilidade Celular	44
2. OBJETIVO	46
3. MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1. Material	47
3.1.1. Reagentes gerais e solventes	47
3.1.2. Equipamentos	48
3.1.3. Material biológico	49
3.2. Métodos	50
3.2.1. Síntese de Peptídeos	50
3.2.2. Purificação dos peptídeos sintetizados	53
3.2.3. Ensaio enzimático	55
3.2.4. Preparação de lipossomas do tipo SUV por extrusão e avaliação da eficiência de encapsulação dos peptídeos	55
3.2.5. Caracterização física dos lipossomas	57
3.2.6. Ensaio de atividade hemolítica	58
3.2.7. Ensaio de Viabilidade Celular	59

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1. Rendimento das sínteses dos peptídeos	61
4.2. Purificação e caracterização dos peptídeos	63
4.3. Preparação dos lipossomas do tipo SUV por extrusão e estudos de encapsulação dos peptídeos	66
4.4. Ensaio de inibição enzimática	73
4.4.1. Enzimas bacterianas DNA girase e topoisomerase IV	73
4.4.2. Enzimas humanas topoisomerase I e topoisomerase II α	78
4.4.3. Ensaio de atividade hemolítica	81
4.5. Ensaio de Viabilidade Celular	83
4.6. Caracterização Física dos lipossomas	87
5. CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS	94

1. Introdução

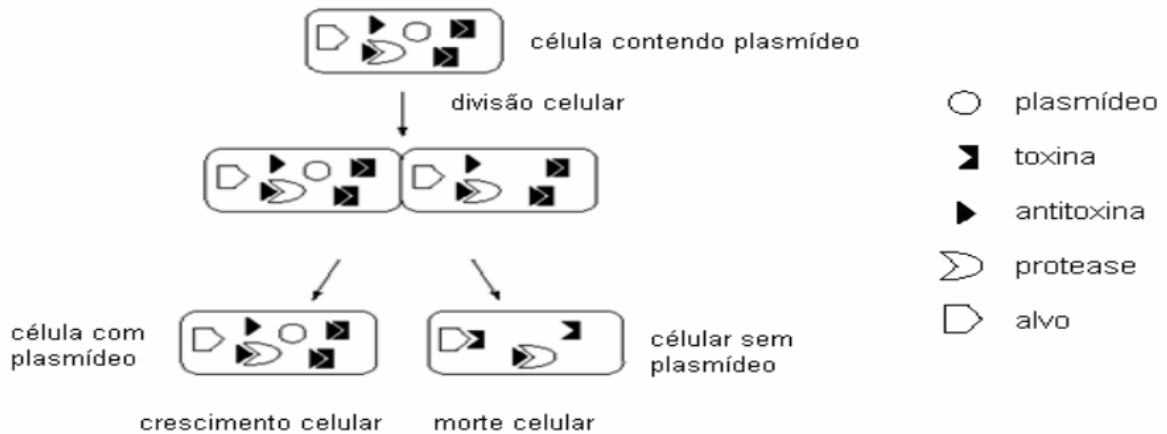
Os peptídeos são biomoléculas que contêm de dois a dezenas de resíduos de aminoácidos unidos entre si através de ligações peptídicas. São também extremamente diversificados em termos funcionais. Muitos atuam como hormônios ou fatores liberadores destes, enquanto outros são neuropeptídeos, neurotransmissores, toxinas, antibióticos, adoçantes ou substratos de proteases. (KO, 2002).

Atualmente, o combate a doenças infecciosas tem sido o objetivo de muitos estudos, pois, uma das principais causas de morte da população são as infecções causadas por microrganismos resistentes aos antibióticos disponíveis para a população, além do mal uso dos medicamentos, como automedicação e uso negligenciado.

Como o desenvolvimento de resistência bacteriana é um processo dinâmico e sua contenção depende de diversas medidas sócio-político-econômicas, torna-se fundamental a busca por novos compostos que possam atuar como novos fármacos a serem utilizados no combate a doenças infecciosas. Nesse contexto, peptídeos com efeito antibiótico produzidos por plantas, animais e microrganismos estão sendo utilizados como modelos para o desenvolvimento de novos medicamentos com aplicações em saúde (REECE & MAXWELL,1991; TROVATTI et al.,2008).

As toxinas intracelulares como CcdB, produzidas por sistemas de morte pós-segregacional (PSK) em bactérias, constitui um exemplo importante da riqueza química e biológica associada a antibióticos com potencial considerável. Estas toxinas exercem sua função sobre um grupo alvo de enzimas denominadas DNA topoisomerases (GERDES et al.,2000).

Em contraste aos antibióticos secretados no ambiente, as toxinas intracelulares atuam atacando a célula a partir do seu interior. Estas toxinas, codificadas por genes plasmidiais, organizados em um mesmo operon (HAYES, 2003), são componentes de PSK, também conhecidos como sistemas toxina/antitoxina (TA), os quais são constituídos além da toxina, que é estável no meio intracelular, por uma antitoxina instável, a qual age prevenindo a expressão da toxina, neutralizando sua ação ou protegendo seu alvo (**Figura 1**).

Figura 1 - Sistema toxina/antitoxina.

Fonte: adaptado de Couturier, Bahassi & Van Melderen (1998).

1.1. DNA topoisomerases

Presentes tanto nos eucariotos como nos procariotos, as DNA topoisomerases são um grupo de enzimas que possuem funções essenciais à viabilidade celular. São responsáveis por modulações topológicas no DNA, essenciais ao metabolismo celular (LOHNER & STRAUDEGGER, 2001). Mesmo sendo a sequência do DNA que determina a constituição genética de um organismo, são as relações topológicas dentro desta mesma molécula que modulam virtualmente todas as funções fisiológicas do genoma (WANG, 2002).

O genoma humano é composto por aproximadamente 4 bilhões de pares de bases de DNA que são inclusos em 46 cromossomos. Apesar do diâmetro de 20 Å do material genético, o DNA do núcleo de uma célula humana mede cerca de dois metros (de uma ponta à outra) (BURDEN & OSHEROFF, 1998). Portanto, para administrar essa quantidade de DNA, é necessário o envolvimento de enzimas, as DNA topoisomerases.

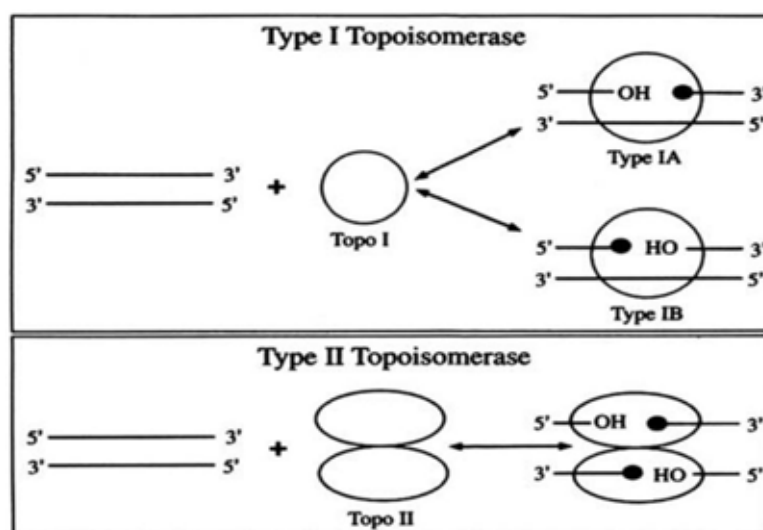
As DNA topoisomerases chamam a atenção dos pesquisadores há décadas. Estas enzimas têm sido descritas em organismos na escala evolutiva desde bactérias até seres humanos. Em 1971, foi feita a primeira descoberta da atividade enzimática em *Escherichia coli*, onde transformava o DNA superenovelado negativamente para uma forma relaxada (WANG, 1971).

As DNA topoisomerases estão relacionadas aos processos topológicos de replicação, transcrição, recombinação, reparo, montagem da cromatina e segregação cromossômica do DNA, pela indução de quebras em simples ou dupla fita na cadeia de DNA.

Existem duas classes de DNA topoisomerases (**Figura 2**). As do tipo I agem pela clivagem transitória de uma das duas fitas do DNA, rodando uma das extremidades sobre a fita não clivada e reunindo as extremidades clivadas. Esta movimentação proporciona uma alteração no número de ligações das fitas, com aumento de uma unidade no número e ligações. As do tipo II (Topoisomerase IV de procariontes e Topoisomerases II- α e II- β de mamíferos) ligam-se à dupla fita de DNA, clivando as duas fitas do DNA simultaneamente (KELLNER et al, 2000) e reunindo-as, posteriormente, resultando num aumento do número de ligações em duas unidades (**Figura 3**).

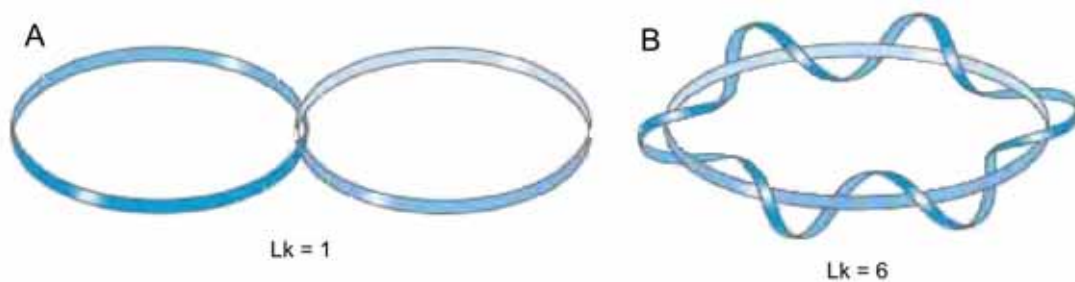
O superenovelamento do DNA, ou seja, a estrutura de dupla-hélice (torção da dupla-hélice sobre seu próprio eixo) e a separação das suas fitas durante a realização de suas funções metabólicas são a origem dos problemas topológicos solucionados pelas DNA topoisomerases. Isso se deve ao fato de uma clivagem transitória em um segmento do DNA, seguida da passagem de outro segmento por essa abertura, reduzindo as tensões presentes na molécula, devido ao seu alto estado de compactação (**Figura 4**).

Figura 2 - Topoisomerase Tipo I, faz a quebra de uma fita de DNA e Topoisomerase do Tipo II cliva ambas as fitas de DNA.



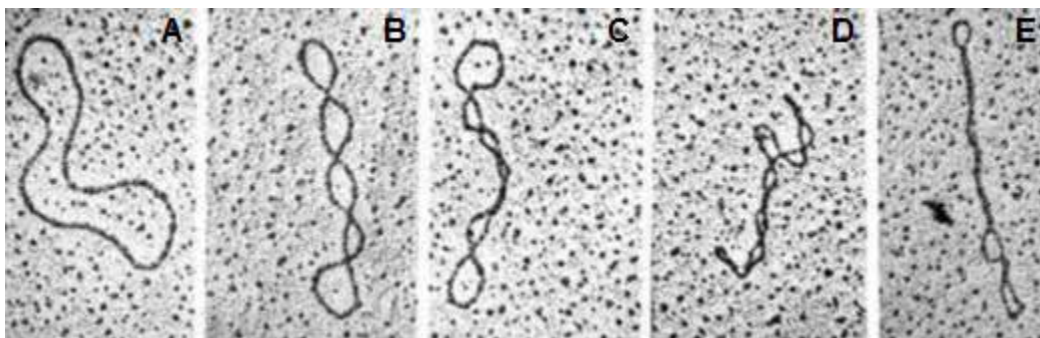
Fonte: Holden (2001).

Figura 3 - Número de ligações, Lk. Em **(A)**, $Lk = 1$, podemos observar apenas um ponto de ligação entre as duas fitas do DNA, enquanto que em **(B)**, observamos a existência de seis pontos de ligações entre as fitas, gerando um $Lk = 6$.



Fonte: Nelson & Cox (2011).

Figura 4 - DNA circular relaxado **(A)**, superenovelado **(B)** e sob ação de uma topoisomerase **(C-D-E)**.



Fonte: Kornberg & Baker (1992).

1.1.1. DNA girase

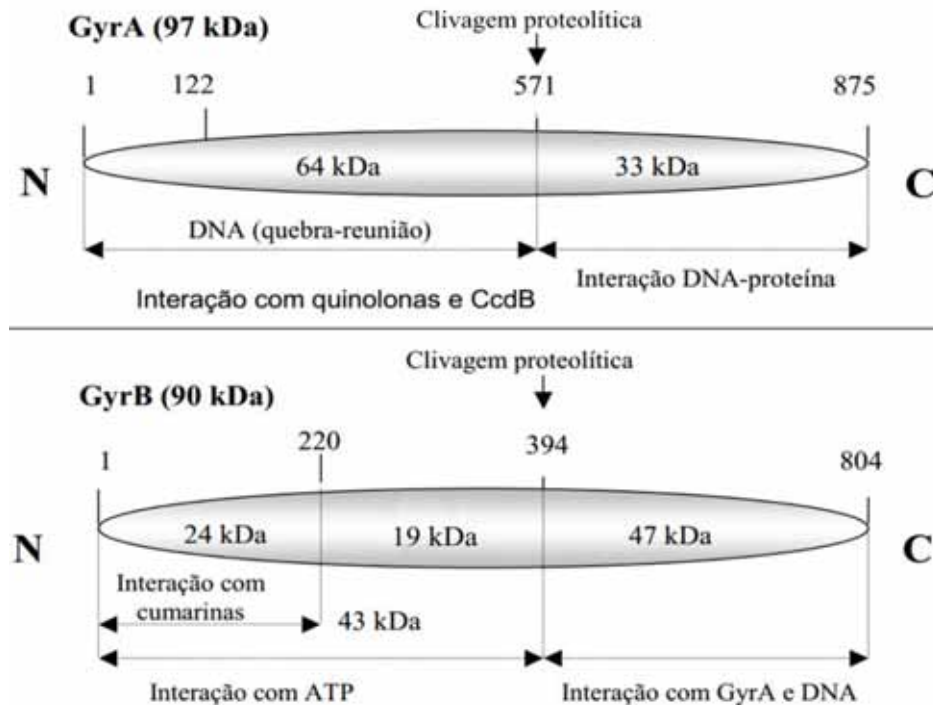
A DNA girase pertence às enzimas bacterianas denominadas DNA topoisomerasas do tipo IIA, descoberta em *Escherichia coli* por Gellert e colaboradores em 1976. É uma enzima que necessita de ATP. A DNA girase é um heterotetrâmero composto por 2 subunidades A e duas subunidades B, organizadas sob a forma A_2B_2 (HOLDEN, 2001). A subunidade A é o produto do gene *Gyr A* e tem um peso molecular de 97 kDa. A subunidade B é o produto do gene *Gyr B* e tem um peso molecular de 90 kDa (LEVINE, 1998) (**Figura 5**).

A subunidade A é formada por uma região amino terminal que é responsável pela quebra e união das fitas de DNA e a região carboxi terminal é responsável pela interação da proteína com o DNA.

A subunidade B possui uma região amino terminal onde há o sítio de ligação do ATP e uma região carboxi terminal que é responsável pela interação com GyrA e o DNA (WIGLEY et al., 1995; ALI et al., 1993)

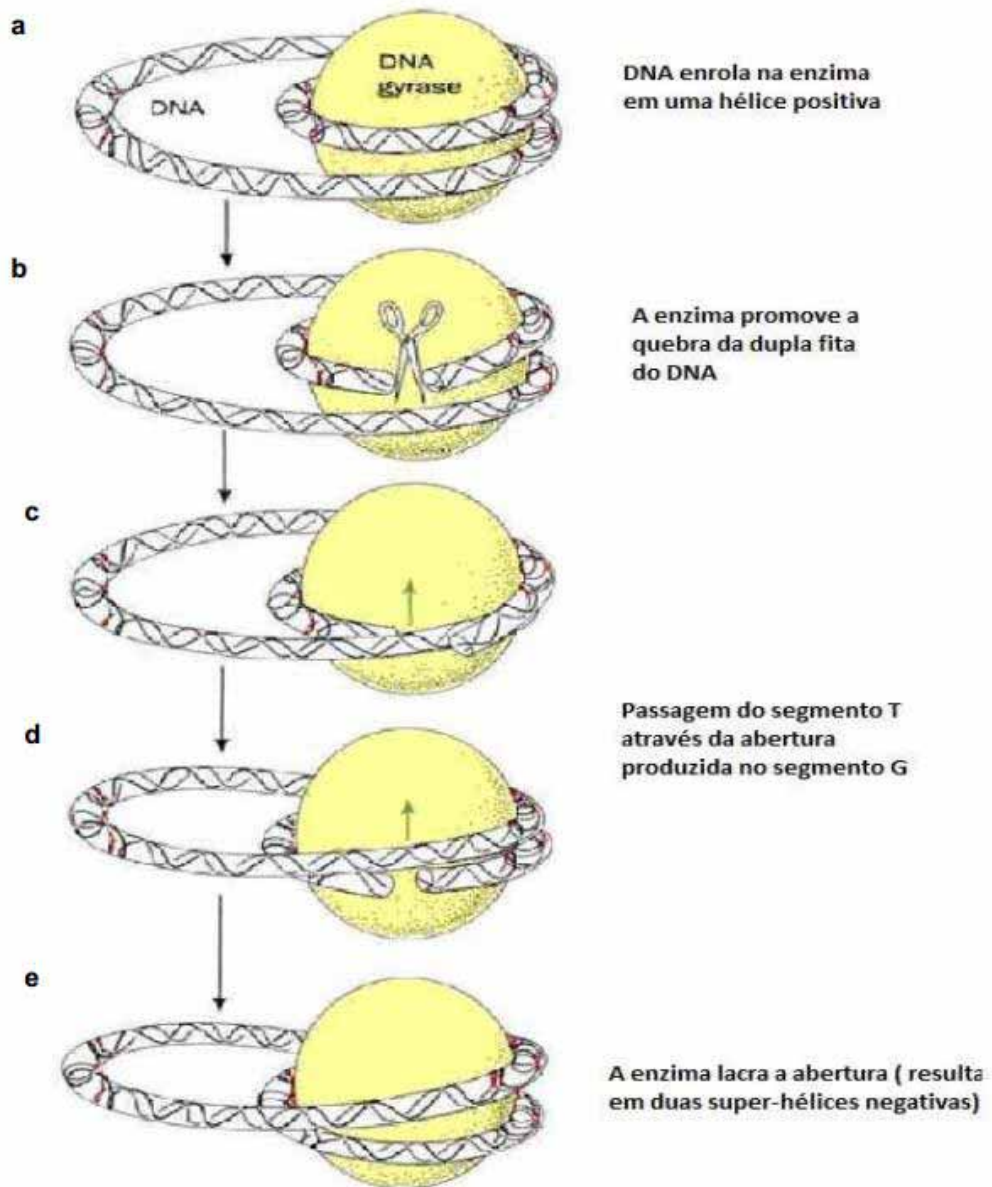
A DNA girase é a única entre as DNA topoisomerasas que é capaz de promover o superenovelamento do DNA. A incubação de DNA circular relaxado com girasse e ATP conduz a produção de DNA superenovelado negativamente. A formação do DNA superenovelado a partir do DNA relaxado sugere que a passagem da fita pela DNA girase deve possuir direção, caso contrário, a passagem da fita formará um substrato pouco superenovelado e conseqüentemente, será anulada pela passagem da fita na direção oposta, levando ao relaxamento.

Figura 5 - Diagramas das regiões específicas presentes nas subunidades GyrA e GyrB da enzima DNA girase.



Fonte: Adaptado de Reece & Maxwell (1991).

Para ocorrer o superenovelamento a DNA girase age catalisando a clivagem transitória em uma das fitas do DNA. Em seguida há a passagem da fita não quebrada através dessa abertura e posteriormente a religação das fitas do DNA. Neste processo, a girase liga-se em um segmento de DNA, formando uma super hélice positiva (**Figura 6-a**). Em seguida, ocorre a ligação de uma molécula de ATP à subunidade GyrB, provocando mudanças conformacionais na enzima que sofre uma rotação. A subunidade GyrB então dimeriza e captura um segmento desse DNA, chamado segmento T. Simultaneamente, Gyr A quebra as duas fitas de DNA de um outro segmento (segmento G) (**Figura 6-b**). O complexo intermediário formado entre o DNA e a enzima é chamado de complexo clivável, onde o DNA está covalentemente ligado à girase através de uma ligação entre a terminação 5' do DNA clivado e um resíduo de tirosina da Gyr A. O segmento T é transportado pela abertura feita no segmento G (**Figura 6-c** e **Figura 6-d**), que após a passagem tem suas fitas religadas (**Figura 6-e**). O segmento T é liberado da enzima por uma abertura transitória na GyrA. Com o religamento das fitas do DNA clivado, duas super hélices negativas são introduzidas. O retorno da enzima à sua conformação original, é feita pela hidrólise da molécula de ATP (ROCA & WANG, 1992; SMITH & MAXWELL, 1998). Como a DNA girase é encontrada somente nos organismos procariotos, é indiscutível sua importância como alvo de agentes antimicrobianos.

Figura 6 - Mecanismo de ação da DNA Girase.

Fonte: Marchetto (2006).

1.1.2. Topoisomerase IV

Em 1990, Kato e colaboradores descobriram uma enzima homóloga à DNA girase, denominada topoisomerase IV. Foi descoberta em mutantes de *Escherichia coli*, os quais são incapazes de segregar cromossomos em células filhas (KATO et al., 1990). Como a DNA girase, a topoisomerase IV possui quatro subunidades. A proteína codificada pelo gene *parC* é homóloga à subunidade GyrA e a proteína codificada por *parE* é homóloga à subunidade GyrB da DNA girase também e capaz de promover a quebra momentânea das duas fitas do DNA, sendo encaixada no grupo das topoisomerases do tipo IIA. No entanto, estas enzimas se diferenciam em um aspecto fundamental: DNA girase liga o DNA ao redor de si mesma, a topoisomerase IV não é capaz de ligar o DNA em torno de si mesma e promover o superenovelamento (PENG et al., 1993).

Esta diferença entre as enzimas favorece a atividade de desencadeamento do DNA após a replicação, enquanto a DNA girase possui maior atividade no relaxamento e superenovelamento do DNA.

Estudos sugeriram que o desencadeamento do DNA era feito pela DNA girase (STECK et al., 1984), mas isso foi antes do conhecimento da topoisomerase IV. Com o descobrimento da topoisomerase IV e sua atividade de desencadeamento e que era incapaz de superenovelar o DNA, acreditou-se que a topoisomerase IV desencadeava o DNA enquanto a DNA girase promovia a remoção dos superenovelamentos que se acumulavam durante a replicação do DNA na fase de alongamento (LEVINE et al., 1988).

Sabe-se que a DNA girase é capaz de promover o relaxamento do DNA, porém, acredita-se que a topo IV também pode funcionar para remover o superenovelamento que ocorre na frente da forquilha de replicação, de modo que essas duas topoisomerases tipo II podem compartilhar o trabalho de alongamento da cadeia de DNA (KHODURSKY et al., 2000).

Alguns compostos são capazes de inibir a ação das topoisomerases bacterianas, como por exemplo, as cumarinas e quinolonas (MAXWELL, 1992, 1993 e 1997). Além destes, algumas proteínas produzidas por microrganismos, como a toxina CcdB e ParE, também são capazes de inibir a ação dessas enzimas, porém, muito ainda deve ser estudado.

1.1.3. DNA Topoisomerase I humana

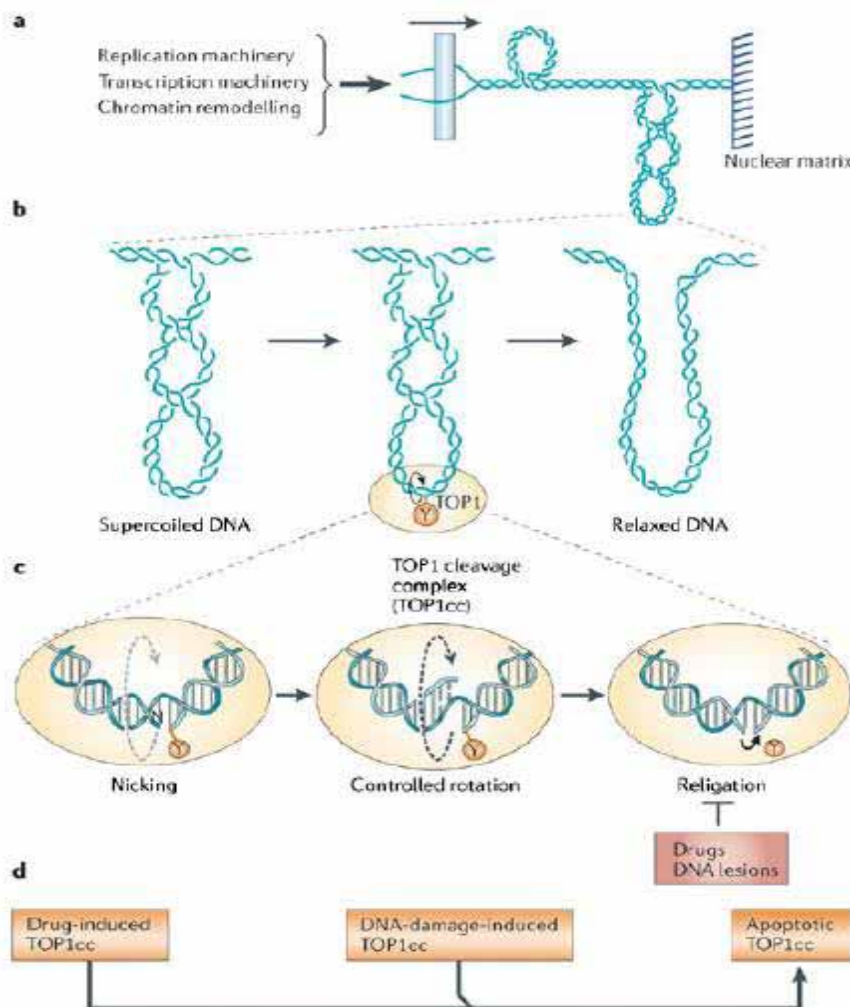
A topoisomerase I (topo I) é uma enzima de 765 aminoácidos (91 kDa) que catalisa o relaxamento do DNA superenovelado negativo e positivo em uma reação que não depende de energia-cofatores ou cátions divalentes (CHAMPOUX,1990)

A atividade desta enzima foi descrita por J.C.Wang em 1971 (KELLNER et al, 2000) como sendo uma proteína monomérica que tem como função relaxar o DNA de plasmídeo superenovelado e é importante destacar que não é uma proteína dependente de ATP.

As topoisomerasas do tipo I são divididas em duas subfamílias baseado na sequência do mecanismo das reações (WANG, 1996). A primeira subfamília (IA) é caracterizada pela ligação covalente da enzima na porção 5' terminal da quebra da fita no intermediário. Os membros da segunda subfamília (IB) se ligam na porção 3' terminal da quebra. O protótipo da subfamília IB, topoisomerase I humana, catalisa a interconversão da dupla fita do DNA pelo corte de uma das fitas do DNA permitindo a rotação de uma região da dupla fita relativamente à outra região (STEWARTT et al.,1998). A quebra com um corte em uma das fitas do DNA, após a ligação covalente da enzima com o fragmento final 3' do esqueleto fosfodiéster do DNA, forma o chamado complexo de quebra. Subsequentemente, a fita cortada pode girar sobre a fita intacta, resultando no relaxamento do DNA. A última etapa do ciclo catalítico é a religação do DNA e posteriormente o desligamento da enzima (CHAMPOUX, 1990). A enzima catalisa reversivelmente a quebra e religação fosfodiéster do DNA via duas reações sucessivas de transesterificação (WANG, 1994; BERGER et al, 1996). Na **Figura 7**, em **(a)** tem-se a geração do DNA superenovelado pela replicação do DNA. O desenrolamento da dupla fita de DNA efetuado por complexos macromoleculares prossegue ao longo do DNA sem girar livremente ao redor da dupla fita que também é incapaz de girar livremente devido ao seu tamanho ou ligação a regiões da matriz nuclear, gerando então o superenovelamento positivo na frente do segmento desenrolado e o superenovelamento negativo por trás. Em **(b)** a introdução da quebra de uma das fitas do DNA pela topoisomerase I fornece pontos de giro que possibilitam a rotação da fita de DNA intacta ao redor da quebra e facilita o relaxamento do DNA. Em **(c)** Primeiramente ocorre a reação de

transesterificação pela qual a tirosina catalítica torna-se ligada a terminação 3' do DNA (corte da fita). Em seguida a tensão da torção resultante do superenovelamento do DNA leva ao giro da terminação 5' da fita de DNA cortada ao redor da fita intacta. A topoisomerase I circula o giro do DNA cortado e atrasa esta rotação. Este processo é chamado de rotação controlada. Finalmente a terminação 5' do DNA cortado é realinhada com a correspondente terminação 3' que permite a religação do DNA (passo final da reação de corte). Em **(d)** Os complexos de dissociação da topoisomerase I podem ser estabilizados sob três condições: 1) drogas como a camptotensina; 2) lesões no DNA que desalinham a terminação 5' do DNA cortado e 3) por modificações no DNA ou topo I que ocorrem durante a morte celular programada (apoptose) (POMMIER, 2006).

Figura 7 - Mecanismo de ação da enzima topoisomerase I humana.

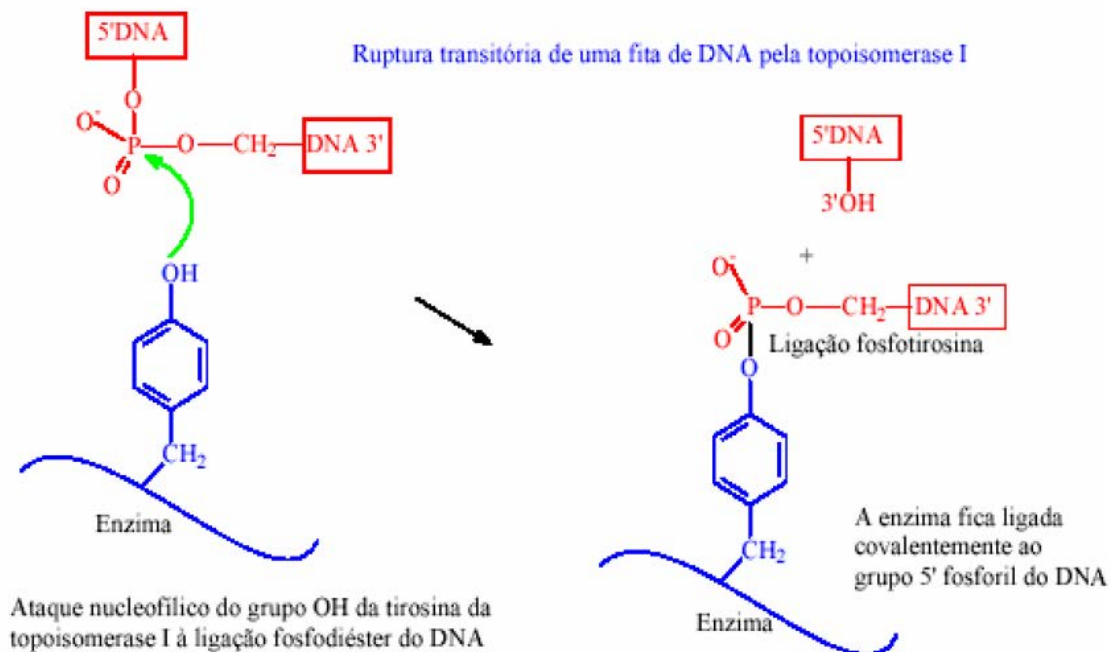


Fonte: Pommier (2006).

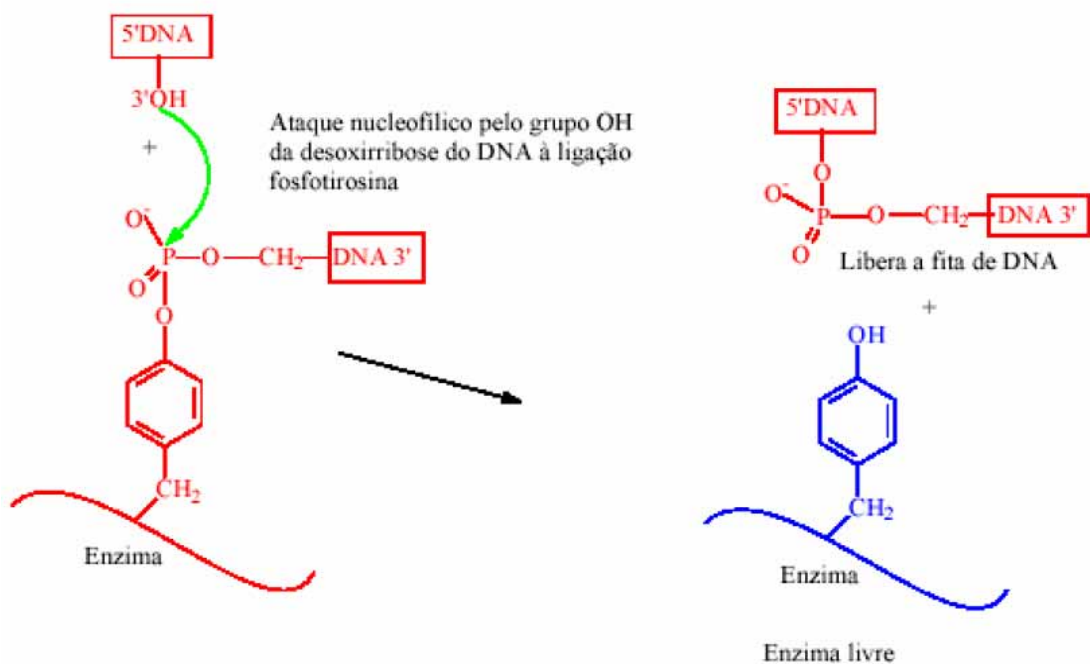
Na **Figura 8** o esquema mostra o mecanismo da reação de transesterificação, a qual permite a quebra da fita de DNA.

Figura 8 - Reação de transesterificação catalisada pela topoisomerase I.

1ª Reação de transesterificação:



2ª Reação de transesterificação:



Fonte: Adaptado de Lins (2008).

1.1.4. Topoisomerase II humana

A atividade desta enzima foi descrita por Gellert e colaboradores em 1976 (KELLNER et al,2000). Em mamíferos, são conhecidas duas isoenzimas, a topoisomerase II- α e β , com genes localizados em cromossomos diferentes.

Diferentemente da topoisomerase I, a topoisomerase II é dependente de ATP para cortar ambas as fitas do DNA e ligar-se covalentemente ao fragmento terminal 5' do DNA. A ação catalítica inicia-se com um corte no DNA, etapa independente de ATP, e subsequente ligação covalente com o fragmento 5' (FORTUNE & OSHEROFF, 1998). A quebra da dupla fita ocorre devido as pontes dissulfeto com o dímero da topoisomerase II (complexo de quebra). Ocorre hidrólise do ATP e a fita dupla do DNA cortado é religada e o dímero da topoisomerase II se liberta do DNA. Esse desligamento resulta na translocação do cromossomo (KELLNER et al, 2000).

A atividade da topoisomerase II ocorre na presença do DNA em espiral durante as etapas de replicação e transcrição, e quando a forma do DNA é linear, esta é essencial na condensação cromossômica e na segregação. Por estas razões a topoisomerase II é altamente expressa durante as fases S, G₂ e M do ciclo celular (CHEN & LIU, 1994; VALKOV & SULLIVAN, 2003).

A fase ou período S (sintético) acontece na interfase do ciclo celular, está entre o G1 e G2 (as células que se apresentam em G1, passam por períodos de crescimento, diferenciação e produção de substâncias, como proteínas).

Durante o período sintético a célula realiza a duplicação de seu material genético, o DNA. Ao final desta etapa, a célula contará com seu DNA duplicado e passará então para a fase seguinte, G2. A fase G2 se caracteriza pela produção de substâncias que irão contribuir para a formação das duas novas células que serão formadas, assim, todas as organelas devem ser duplicadas.

1.2. A Toxina Natural CcdB

O agente natural CcdB é uma proteína de 11,7 kDa, composta por uma sequência de 101 resíduos de aminoácidos, relatado por Loris e colaboradores em 1999. Esta proteína é codificada pelo locus *ccd* do Plasmídeo F, o qual é um fator de conjugação bacteriana, amplamente estudado em *Escherichia coli*.

Apesar de estar presente em pequeno número nas células, este fator de conjugação é conservado nas linhagens bacterianas, pois, além de possuir um sistema que permite sua distribuição entre as células filhas durante a divisão celular, também codifica sistemas de morte celular programada que favorecem as células que o contêm causando a morte daquelas que não o receberam durante a divisão celular (OGURA & HIRAGA, 1983; MIKI et al., 1984, JAFFE et al., 1985).

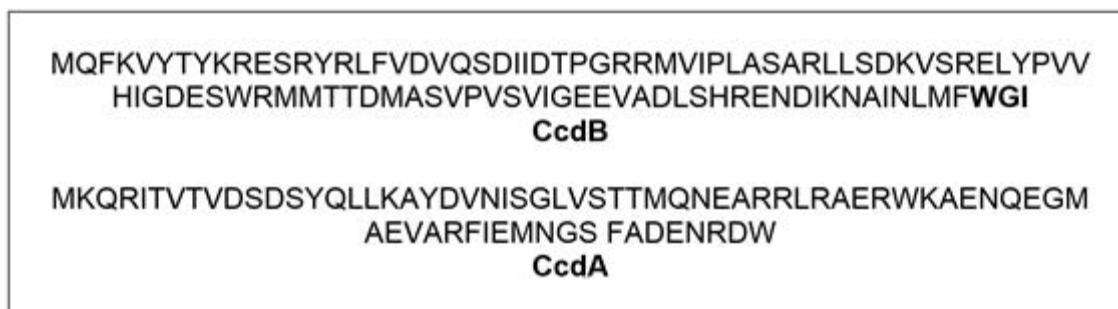
Os sistemas toxina-antitoxina (TA) codificam um sistema que consiste em uma toxina que é estável e uma antitoxina que neutraliza os seus efeitos, porém esta antitoxina é susceptível à degradação de proteases específicas. Para que os efeitos tóxicos da toxina sejam evitados, a antitoxina é produzida continuamente. Os plasmídeos têm mostrado uma grande variedade para codificar mecanismos reguladores que auxiliam na manutenção do crescimento celular, estabilizando-o. Sistemas TA foram inicialmente descobertos como mecanismo de manutenção de plasmídeo pela morte das células filhas bacterianas que não receberam o plasmídeo na divisão celular, processo este denominado morte pós-segregacional (PSK). Nas células que contêm o plasmídeo, tanto a toxina quanto a antitoxina são sintetizadas.

Existem vários tipos de sistema toxina-antitoxina, os sistemas variam do tipo I ao tipo V (BARBOSA *et al.*, 2014). Em um desses sistemas (tipo II), o CcdB age como uma toxina e o CcdA, uma proteína de 8,7 kDa, como a antitoxina (**Figura 9**). Na ausência do CcdA, o CcdB pode matar a bactéria através de um mecanismo no qual a enzima DNA girase está envolvida.

A ação do CcdB sobre a DNA girase foi identificada inicialmente por Bernard e Couturier (1992), que descreveram o isolamento, o mapeamento, o sequenciamento e as propriedades das bactérias mutantes resistentes a atividade citotóxica do CcdB.

A ação tóxica do CcdB provoca a morte celular através de um processo que converte a DNA girase em um agente citotóxico. Interferindo na atuação da enzima, o CcdB induz a clivagem do DNA via DNA girase, ligando-se ao complexo DNA/enzima e estabilizando-o, o que além de gerar uma lesão no DNA, bloqueia a transcrição pela T7 RNA polimerase (CRITCHLOW et al., 1997).

Figura 9 - Aminoácidos que compõem a toxina CcdB e a antitoxina CcdA.



Fonte: Garrido (2007).

1.2.1. Análogos da Toxina Natural CcdB

Em estudos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa (TROVATTI, 2006; GARRIDO, 2007) foram desenhados dois análogos peptídicos (CcdBET-2 e CcdBSG-2), baseados na estrutura primária da toxina CcdB a partir de dois fragmentos da sequência proteica, um incluindo a dobra lateral e outra incluindo uma folha- β na posição N-terminal, somados a sequência localizada entre os resíduos de Ser84 até Ile101, a única região em α -hélice da estrutura do CcdB (**Figura 10**).

Ensaio realizados com estes peptídeos mostraram atividade inibitória de ambos sobre as reações de superenovelamento da DNA girase e de relaxamento da topoisomerase IV.

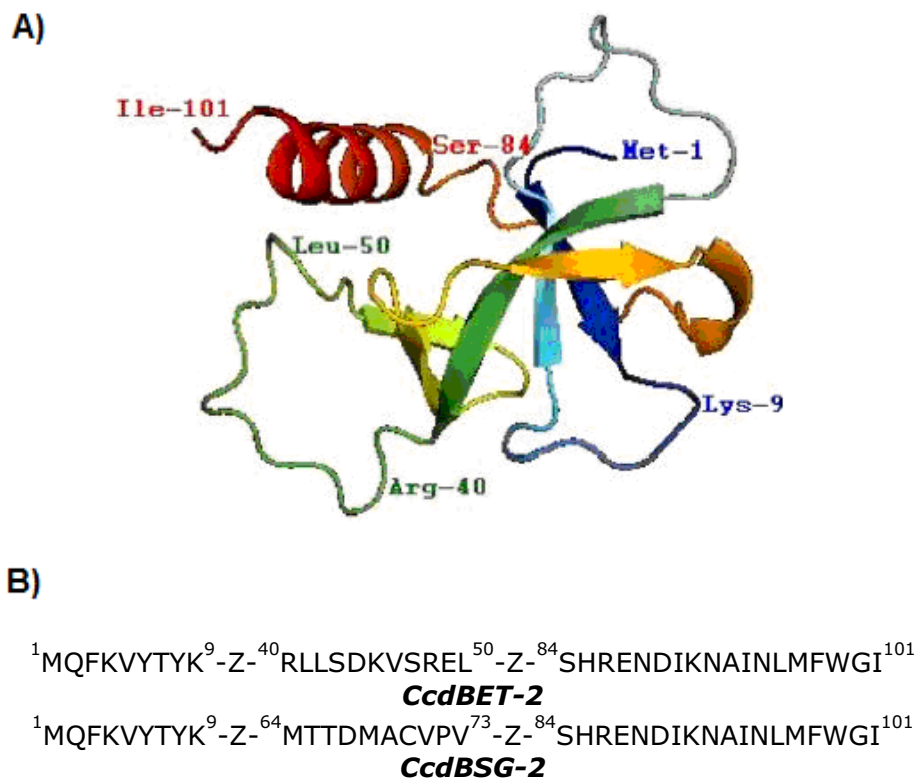
No entanto, algumas características particulares dos peptídeos tais como solubilidade, tamanho, presença de carga efetiva, alta complexidade estrutural, dentre outras, acaba influenciando de maneira negativa a aplicação dessas estruturas para fins terapêuticos.

Sendo assim, estudos mais aprofundados envolvendo estes peptídeos seriam necessários para possibilitar, de fato, a eficácia terapêutica e especificidade dessas moléculas a seus alvos celulares.

Dentre os alvos efetivos para ação dos peptídeos, é possível identificar uma vasta variedade de componentes celulares, organelas específicas, tecidos e órgãos, podendo variar conforme as diferentes aplicações destas moléculas. No entanto, cada um desses alvos está localizado em ambientes distintos, podendo estar tanto no interior de uma célula (caso específico das enzimas alvo DNA

girase e topoisomerase IV) ou, até mesmo nos tecidos de um órgão específico do corpo.

Figura 10 - Em (A): Representação esquemática da estrutura proteica do CcdB. (B): Estruturas primárias dos peptídeos CcdBET-2 e CcdBSG-2. (Z = ε-amino hexanóico).



Fontes: Trovatti et al. (2008) (A); Adaptado de Garrido (2007) (B).

Testes *in vivo* com os peptídeos CcdBET-2 e CcdBSG-2 demonstraram a incapacidade de inibição do crescimento celular bacteriano. Este fato pode ser atribuído à dificuldade que estas moléculas apresentam na translocação através da membrana celular bacteriana, para que os mesmos possam atingir seus alvos efetivos. Dessa maneira, com a crescente descoberta de moléculas peptídicas biologicamente ativas, existe também uma maior necessidade no desenvolvimento de técnicas cada vez mais avançadas e específicas de administração dessas substâncias, para que as mesmas possam atingir efetivamente seus respectivos alvos com maior eficiência e rendimento, desenvolvendo rapidamente uma resposta biológica esperada.

1.3. Sistemas de liberação controlada de fármacos

Em meados da década de 1960, ocorreram as primeiras tentativas de obtenção de um sistema, baseado em vesículas de nylon, capaz de transportar biomoléculas (CHANG, 1964). Entretanto, essa tentativa fracassou, uma vez que esse material artificial se acumula no organismo.

Durante a década de 60, o termo lipossoma foi utilizado por Alec Bangham para descrever as estruturas de bicamadas multilamelares formadas pela adição de excesso de água a fosfolípídeos secos (BANGHAM et al., 1972). Em 1971, Gregory Gregoriadis e colaboradores propuseram pela primeira vez, a utilização dos lipossomas como sistema transportador de fármacos, mantendo desde então um papel preponderante no desenvolvimento desta área.

As vesículas podem ser preparadas a partir de misturas lipídicas naturais extraídas e purificadas, ou a partir de lipídeos sintéticos, disponíveis comercialmente. Segundo New (1990), os fosfolípídeos mais utilizados na construção de modelos de membranas são as moléculas de fosfatidilcolina, provavelmente em razão de sua carga neutra, inércia química e similaridade com as membranas biológicas. A fosfatidilcolina, conhecida também como lecitina, pode ser derivada de fontes naturais e sintéticas, podendo ser obtida a partir da gema dos ovos e grãos de soja.

Diferentes tipos de lipídios como estearilamina, colesterol e polietilenoglicol (PEG) podem gerar carga e estabilidade à vesícula e, conseqüentemente, proporcionar maior adesão e interação da vesícula com a membrana celular.

Assim, o uso de fosfolípídios na composição tem por finalidade dar à partícula uma semelhança estrutural com a membrana celular, conferindo características como fluidez e maior interação devido à semelhança estrutural com componentes da membrana celular bacteriana. Já o uso de colesterol e PEG, além de conferir ausência de carga à partícula, visa dar maior rigidez e resistência à vesícula, podendo melhorar a encapsulação do fármaco na vesícula, bem como aumentar sua biodisponibilidade (DRULIS-KAWA & DOROTKIEWICZ-JACH, 2010).

Devido à natureza dos componentes usados em sua preparação, lipossomas são considerados vesículas biocompatíveis e podem proporcionar

redução da toxicidade inerente ao fármaco, como também aumento da eficácia da substância ativa (VEMURIS & RHODES, 1995; OLIVEIRA et al., 1997).

Os lipossomas podem ser definidos como associações coloidais de lipídeos anfipáticos, que se organizam espontaneamente em estruturas fechadas do tipo “concha esférica”. Os lipossomas (**Figura 11**) podem ser classificados em termos de tamanho, número de lamelas (e sua posição relativa), constituição lipídica (o que também condiciona a sua carga), estabilidade e modo de preparação (LICHTENBERG & BARENHOLZ, 1988). Devido à sua estrutura variável, relacionada ao tamanho, composição, carga superficial e fluidez da bicamada, os lipossomas são capazes de encapsular compostos polares e apolares.

Substâncias hidrofílicas podem ser encapsuladas no compartimento aquoso, enquanto que substâncias lipofílicas podem ser incorporadas na bicamada lipídica (LOPES & OLIVEIRA, 2000).

Figura 11 - Representação esquemática de lipossomas. Em (A) modelo de lipossomas unilamelar e multilamelar. Em (B) mostrando a base de sua classificação em termos de tamanho, número de lamelas e sua posição relativa.



Fontes: Chorilli (2004) (A); Adaptado de Santos e Castanho (2002) (B).

Alguns estudos clínicos utilizando combinações de ciprofloxacina com lipossomas mostraram resposta depois de 14 dias de tratamento contra osteomielite causada por *Staphylococcus aureus* (KADRY et al., 2004). Outro estudo mostra resultados da combinação dos mesmos fármacos na inibição de crescimento de *in vivo* de *Salmonella thyphimurium*, que é uma espécie bacteriana resistente à vancomicina (WEBB et al., 1998).

Nesse sentido, torna-se promissora a utilização de lipossomas para promover o transporte de peptídeos com potencial antimicrobiano para o interior das células bacterianas. Por ser um tipo de partícula de composição muito próxima a de uma membrana bacteriana, pode-se especular quanto à possibilidade de contornar as dificuldades encontradas nas tentativas frustradas com a administração dos peptídeos na sua forma livre em solução, onde foi possível observar sua incapacidade de permeação através das mesmas.

1.4. Ensaios de viabilidade Celular

Os testes de viabilidade celular são indicados para avaliar a ação de substâncias em qualquer organismo que contribua para um processo infeccioso que justifique o uso de um antimicrobiano. Ao utilizar esse tipo de ensaio, é possível verificar a sensibilidade do microrganismo frente ao composto ministrado, neste caso, aos análogos CcdBET-2 e CcdBSG-2. Para testar a sensibilidade e viabilidade das células bacterianas, a organização americana *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI antes denominada como *Nacional Committee for Clinical Laboratory Standards*, NCCLS) sugere a metodologia de microdiluição que envolve o uso de pequenos volumes de caldo colocados em placas de microdiluição estéreis de fundo redondo ou cônico.

A metodologia possibilita a obtenção da concentração inibitória mínima (CIM) que é a menor concentração de agente antimicrobiano necessária para a completa inibição do crescimento do microrganismo.

A inibição bacteriana pode ser medida de forma quantitativa mediante a leitura em espectrofotômetro. Uma estratégia que pode ser utilizada para auxiliar nesta leitura é a adição do reagente resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido). Este reagente, de cor azul, é oxidado à resofurina de coloração vermelha, na presença de células viáveis.

Outra técnica utilizada para testar a sensibilidade de microrganismos, é a de diluição em ágar, onde o composto antimicrobiano é incorporado ao ágar, sendo que utiliza-se placas distintas com concentrações variadas dos compostos teste. Os inóculos podem ser aplicados rápida e simultaneamente às superfícies de ágar usando um aparelho de replicação de inóculo. O inóculo pode ser preparado de uma forma padrão para a realização do teste, portanto, deve-se

cultivar o microrganismo até uma turbidez equivalente a 0,5 da escala de McFarland, isto significa que há aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC/mL).

A CIM é registrada descartando qualquer colônia única ou turvação leve causada pelo inóculo. Se duas ou mais colônias persistirem em concentrações do composto além do ponto final óbvio, ou se não houver crescimento em concentrações mais baixas, e sim em concentrações mais altas, será necessário verificar a pureza da cultura e, possivelmente, repetir o teste.

As técnicas acima descritas são amplamente empregadas para testes de viabilidade celular, no entanto, em casos onde se utiliza sistemas lipossomais, os lipídeos utilizados para a confecção de vesículas podem interferir nos resultados de leitura das absorbâncias. Além disso, o tamanho da partícula inviabiliza o processo da técnica de diluição em ágar.

Uma técnica alternativa é a medida da viabilidade celular utilizando o reagente MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide). Este é um ensaio colorimétrico, assim como a resazurina, porém, se baseia na clivagem do sal amarelo tetrazólio (membrana permeável) para cristais de formazan azuis / púrpura por células metabolicamente ativas.

Os cristais de formazan formados durante o processo podem ser quantificados espectrofotometricamente por dissolução em um solvente orgânico, e a concentração é diretamente proporcional ao número de células metabolicamente ativas na cultura (GABRIELSON et al, 2002; RAHMAN et al.,2004; STENTELAIRE et al., 2001; TUNNEY et al., 2004). Dimetilsulfóxido (DMSO) é considerado um dos solventes mais adequados para dissolução, devido à sua elevada eficiência de solubilização e baixa volatilidade (CARMICHAEL et al, 1987; MORGAN, 1998).

2. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho é estudar a relação da composição química de lipossomas com a eficiência de encapsulação de miméticos peptídicos de CcdB de diferentes características, bem como a eficiência do transporte dos mesmos ao interior das células.

Para isso os seguintes itens foram propostos como objetivos específicos para a realização desta pesquisa:

- 1) Sintetizar, purificar e caracterizar os análogos peptídicos de CcdB denominados CcdBSG-2 e CcdBET-2 utilizando a técnica de síntese de peptídeos em fase sólida;
- 2) Marcar os peptídeos com marcador fluorescente (carboxifluoresceína)
- 3) Associar os peptídeos propostos em lipossomas do tipo SUV de 100 nm de diâmetro preparados pelo método de extrusão/evaporação;
- 4) Avaliar a citotoxicidade dos peptídeos sintetizados através de ensaios hemolíticos e ensaios de inibição da atividade de DNA topoisomerasas humanas;
- 5) Estudar a atividade de inibição de crescimento microbiano alcançadas por estes sistemas lipossomas-peptídeos.

3. Material e Métodos

3.1. Material

3.1.1. Reagentes gerais e solventes

- Resina (suporte polimérico): Fmoc-Ile-Wang com grau de substituição inicial de 0,69 mmol/g da marca Novabiochem®.

- Aminoácidos protegidos: todos os aminoácidos utilizados neste trabalho apresentavam a extremidade amino-terminal protegida com o grupo base-lábil Fmoc. Esses aminoácidos foram adquiridos da Novabiochem® ou AAPPTec®.

- Os agentes de condensação utilizados na síntese dos diferentes análogos, N-Hidroxibenzotriazol (HOBt) e N,N'-Diisopropilcarbodiimida (DIC), foram adquiridos da Novabiochem® e Fluka®, respectivamente.

- Como reagente de desproteção do grupo Fmoc, foi utilizada uma solução 20% (v/v) de piperidina, da marca Merck®, em DMF.

- O reagente utilizado para a clivagem ácida final foi o ácido trifluoracético (TFA), adquirido da Fluka®.

- Etanoditiol (EDT), tioanisol e fenol, substâncias responsáveis pela captura de espécies responsáveis por alquilação eletrofílica e liberadas no meio reacional durante o processo de clivagem ácida, foram adquiridos da Sigma® e Acros®, respectivamente.

- Os eluentes cromatográficos utilizados foram acetonitrila da marca Mallinchrød® e água ultrapura, obtida através do sistema de filtração Barnstead, equipado com cartuchos para retenção de sais e de compostos orgânicos.

- Os lipídeos utilizados para a síntese de lipossomas foram adquiridos da Merck® e da AvantiPolar®.

- Demais reagentes e solventes como ácido acético glacial, anidrido acético, diclorometano (DCM), diisopropiletilamina (DIEA), dimetilformamida (DMF), hexafluoroisopropanol e N-metilpirrolidona (NMP), foram adquiridos da Merck®, Aldrich®, Mallinchrød®, Baker® e Fluka®.

3.1.2. Equipamentos

- Sistema de Cromatografia líquida em modo analítico: Cromatógrafo Shimadzu LC-10A/C-47A equipado com uma coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18 (150 x 4,6mm; 5 µm; 300 Å). O aparelho possui três bombas LC 10AT, injetor automático SIL 10AF e detectores de UV SPD 10A e fluorescência RF 10A.

- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em modo semi-preparativo: cromatógrafo Beckman System Gold, equipado com coluna de fase reversa Phenomenex Júpiter C18 (250 x 10mm; 5µm; 300 Å). O equipamento é composto por duas bombas modelo 116 e detector UV/Visível, conectado a um registrador 112 da Amersham Biosciences.

- Espectrofluorímetro Varian modelo Cary Eclipse, interfaciado em microcomputador Dell, controlado pelo software Cary Eclipse, para aquisição e manipulação de dados;

- LC/ESI-MS constituído por um UFLC Shimadzu composto por duas bombas LC 20AD, detector "UV-visível" modelo SPD 20A, injetor automático modelo SIL 20AHT e um espectrômetro de massas Bruker modelo Amazon SL. O sistema é controlado por uma Workstation empregando o Software LC-Solution.

- Eletroforese: sistema de eletroforese GNA 100, equipado com fonte Pharmacia Biotech modelo EPS 301.

- Fotodocumentador Alpha Imager EP system da Alpha Innotech.

- Equipamento para avaliar espalhamento de luz dinâmico (DSL, Zetasizer Nano NS, Malvern Instruments, Malvern, UK) – fonte de laser He-Ne 4,0 mW, 633 nm.

- Outros equipamentos como banho termostaticado, estufa, centrífuga, autoclave, câmera fotográfica, transiluminador de luz ultravioleta, micropipetas e vidrarias comuns de laboratório.

3.1.3. Material biológico

As enzimas bacterianas (DNA girase e Topoisomerase IV) e humanas (topoisomerase I α e topoisomerase II α), todas preparadas a partir de linhagens superprodutoras, foram adquiridas comercialmente da Inspirallis[®], e foi fornecida com os seguintes tampões:

- DNA girase:

Tampão de diluição: Tris.HCl 50 mmol.L⁻¹; KCl 100 mmol.L⁻¹; Ditioneitol 2 mmol.L⁻¹; EDTA 1 mmol.L⁻¹; Glicerol 50% (m/v); pH = 7,5

Tampão de ensaio (concentrado 5x): Tris. HCl 35 mmol.L⁻¹; KCl 2,4 mmol.L⁻¹; MgCl₂ 4 mmol.L⁻¹; Ditioneitol I, mmol.L⁻¹; Espermidina 1, mmol.L⁻¹; ATP 1 mmol.L⁻¹; Glicerol 6,5% (m/v); Albumina 0,1 mg/mL; pH = 7,5.

- Topoisomerase IV:

Tampão de diluição: HEPES-KOH 50 mmol.L⁻¹; glutamato de potássio 100 mmol.L⁻¹; Ditioneitol 1 mM; EDTA 1 mM; Glicerol 40% (v/v); pH = 7,6

Tampão de ensaio (concentrado 5x): HEPES-KOH 50 mM; glutamato de potássio 100 mmol.L⁻¹; acetato de magnésio 10 mmol.L⁻¹; Ditioneitol 10 mmol.L⁻¹; ATP 1 mmol.L⁻¹; Albumina 50 μ g/mL; pH = 7,6.

- Topoisomerase I α :

Tampão de diluição: Tris. HCl 10 mmol.L⁻¹ (pH 7,5); 1mM DTT; 1 mmol.L⁻¹ EDTA; 100 mmol.L⁻¹ NaCl; glicerol 50% (v/v); 100 μ g/ml albumina.

Tampão de ensaio: (10X concentrado) Tris. HCl 20 mmol.L⁻¹ (pH7.5); 200 mmol.L⁻¹NaCl; 0,25 mmol.L⁻¹ EDTA; 5% glicerol; 50 μ g/mL albumina.

- Topoisomerase II α :

Tampão de diluição: Tris. HCl (pH 7,5) 50mM; 100 mmol.L⁻¹ NaCl, 1mM DTT; 0,5 mmol.L⁻¹ EDTA; glicerol 50% (v/v); 50 μ g/mL albumina.

Tampão de ensaio: (10X concentrado) Tris. HCL 50 mmol.L⁻¹ (pH 7,5); 125 mmol.L⁻¹ NaCl; 10 mmol.L⁻¹ MgCl₂; 5 mM DTT; 100 µg/mL albumina; ATP 1 mmol.L⁻¹

- As linhagens bacterianas utilizadas nos ensaios microbiológicos foram *Staphylococcus Aureus* (ATCC 14458 - Lote: 1007005) e *Escherichia coli* (EHEC) (ATCC 43895 – Lote: 0507171). O meio de crescimento utilizado foi Mueller Hinton 22 g/L (Biolog – MHB 10608) e ágar bacteriológico 15 g/L (Acumedia). Para o controle negativo de crescimento bacteriano, utilizou-se o antibiótico novobiocina 100 µM (Sigma- Aldrich - N1628) e Ciprofloxacina Hydrochloride 100 µM (Sigma-Aldrich – Lote: P500044).

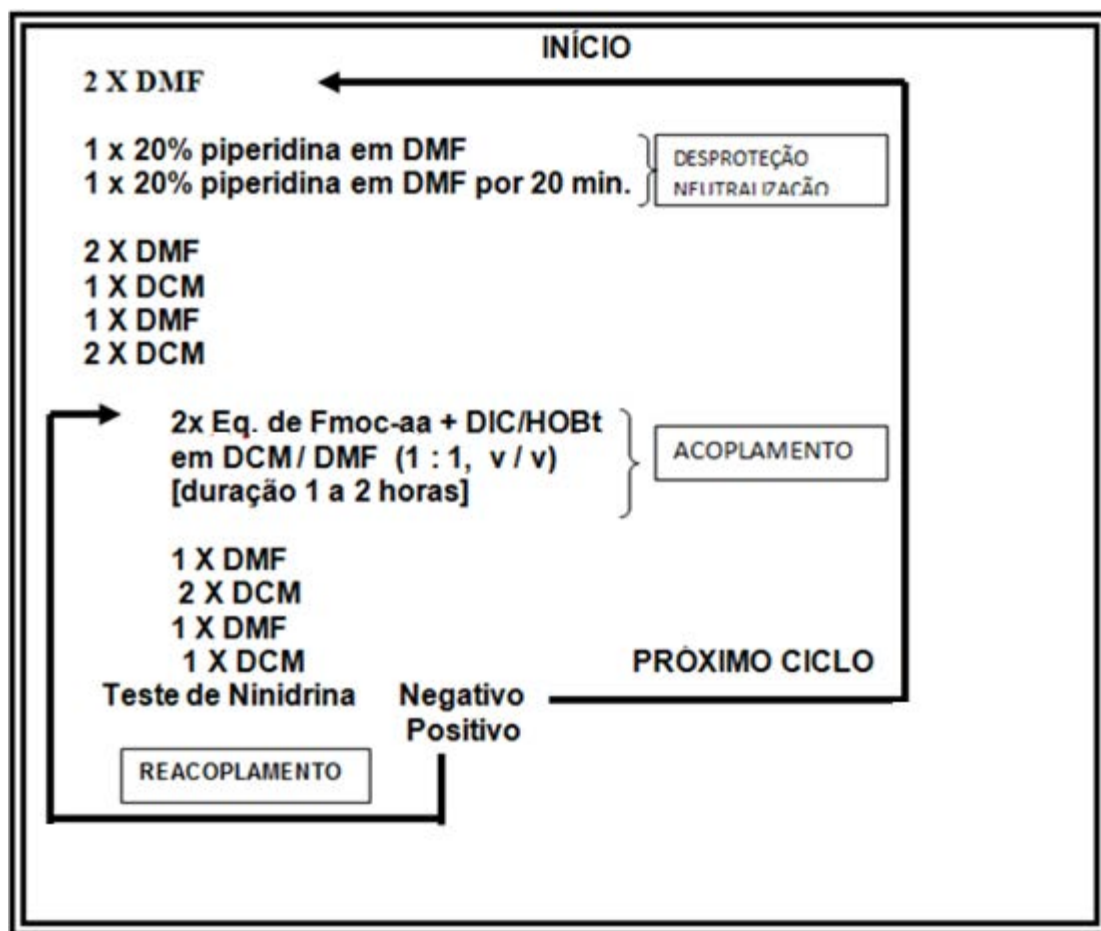
3.2. Métodos

3.2.1. Síntese de Peptídeos

As sequências peptídicas dos análogos CcdBET-2 e CcdBSG-2 (Figura 10B) foram sintetizadas manualmente pelo método de síntese em fase sólida (STEWART & YOUNG, 1984; LLOYD-WILLIAMS & ALBERICIO; GLIRALT, 1997; AMBLARD et al., 2005) de acordo com o protocolo padrão que emprega o grupamento 9-fluorenilmetiloxycarbonil (F-moc) como protetor base-lábil dos α-amino grupos, e derivados t-butílicos (t-bu) para proteção das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos trifuncionais. A resina de partida foi uma resina de Wang com grau de substituição inicial de 0,69 mmol/g, já contendo o primeiro aminoácido comum nos dois peptídeos (isoleucina - Ile) previamente incorporado. Durante os acoplamentos dos aminoácidos subsequentes, utilizou-se Diisopropilcarbodiimida (DIC) e 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) como agentes de condensação. Na etapa de acoplamento de cada aminoácido, foi empregado um excesso molar de 3 vezes, em relação a quantidade inicial de resina, tanto para Fmoc-aminoácidos quanto para os agentes de condensação, aplicando-se inicialmente como solvente, uma mistura de diclorometano/dimetilformamida (DCM/DMF 1:1, v/v), por um período de 2 horas, em média. A desproteção dos grupos α-amino (remoção do grupo base lábil Fmoc), após o acoplamento de cada aminoácido, foi realizada empregando-se uma solução 20% de piperidina

em DMF. Na **Figura 12** está representado um esquema resumido do protocolo de síntese de peptídeo em fase sólida (SPFS).

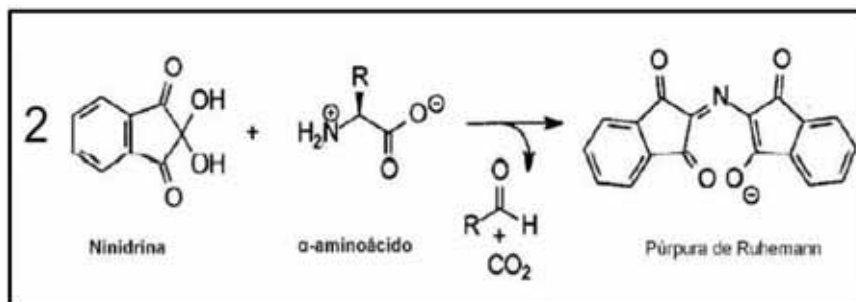
Figura 12 - Protocolo utilizado para Síntese de Peptídeo em Fase Sólida (SPFS).



Fonte: Adaptado de Lorenzón (2011).

A eficiência das etapas de acoplamento de cada aminoácido foi monitorada pelo teste de ninidrina (KAISER et al., 1970) e, quando positivo (**Figura 13**), indicando a presença de α -amino grupos livres, o processo foi repetido com 50% da quantidade inicial dos reagentes. Acetilação, quando necessária, foi feita com anidrido acético e Diisopropiletilamina (DIEA) (10 equivalentes cada) em DMF, por 30 minutos.

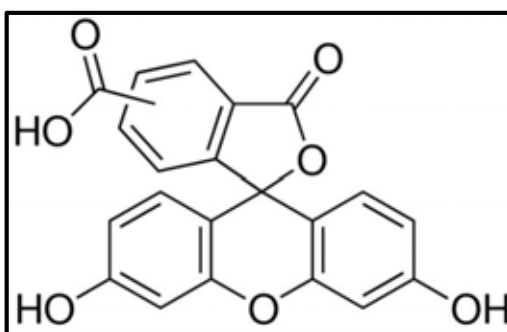
Figura 13 - Reação dos aminos grupos livres dos aminoácidos com a ninidrina, produzindo um composto de coloração azul-violácea.



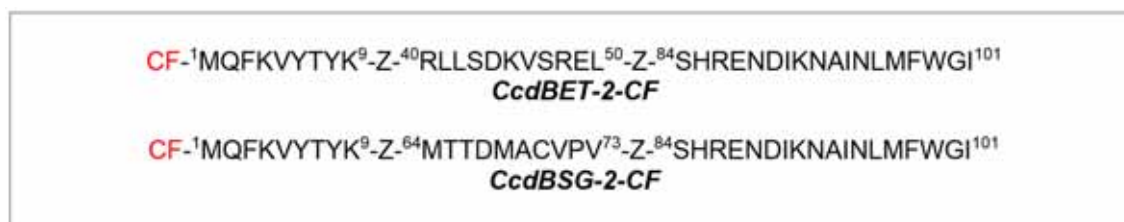
Fonte: Adaptado de Garcia (2010).

Prevendo a necessidade de avaliação da capacidade de transporte dos análogos peptídicos CcdBET-2 e CcdBSG-2 promovida pelo sistema de liberação a ser utilizado neste trabalho (lipossomas), optou-se por adicionar a cada um desses peptídeos, uma sonda fluorescente na extremidade carboxila terminal. Para esta finalidade, utilizou-se o composto carboxifluoresceína (CF) (**Figura 14**), o qual foi acoplado aos resíduos de metionina (M) utilizando as mesmas condições de acoplamento de um aminoácido descritas anteriormente (**Figura 15**).

Figura 14 - Estrutura da molécula de 5 (6) – Carboxifluoresceína acoplada na extremidade amino terminal dos análogos peptídicos



Fonte: Sigma Aldrich disponível em: –
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/21877?lang=pt®ion=BR>

Figura 15 - Estrutura primária dos peptídeos com carboxifluoresceína (CF).

Fonte: Adaptado de Garrido (2007).

A clivagem final dos peptídeos das respectivas resinas e a desproteção dos grupos protetores das cadeias laterais foi efetuada pelo tratamento das respectivas peptidil-resinas com uma solução de clivagem contendo TFA (94%), água deionizada (2,5%), EDT (2,5%) e TIS (1%), a 25°C por 3 horas em agitação branda. Para cada 100 mg de resina, 1,5 mL de solução foi preparada. Após o período de 3 horas, foi adicionado éter etílico gelado ao conteúdo do frasco e observado a formação de um precipitado branco (peptídeo bruto). A mistura foi agitada manualmente e transferida para tubos tipo "falcon" de centrífuga de 15 mL de capacidade volumétrica, sendo submetidos a centrifugação por 15 minutos a 10.000 rpm. Após o período o sobrenadante foi descartado em frasco precaução. O processo de lavagem com éter foi repetido mais 3 vezes. Após as lavagens, o precipitado secou em sistema vácuo por cerca de 4-6 horas com as tampas semiabertas para evaporação do excesso de solventes orgânicos. Após a secagem a vácuo, o peptídeo foi extraído utilizando cerca de 100 mL de solução aquosa contendo 10% de acetonitrila (v:v).

3.2.2. Purificação dos peptídeos sintetizados

A purificação dos peptídeos foi feita por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizando as seguintes escalas e condições cromatográficas:

- Escala Analítica

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi realizada em modo analítico em um cromatógrafo Shimadzu LC-10A/C-47A, empregando uma coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18 (15 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å), com um 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 e detecção a 220 nm.

Os solventes utilizados foram todos de grau cromatográfico e a água empregada foi do tipo ultrapura.

No geral, as condições cromatográficas foram:

- coluna: fase reversa C18, Phenomenex Jupiter (250 x 4,6 mm); diâmetro da partícula = 5 µm; porosidade 300Å.
- solventes: A) Água contendo 0,045% de TFA
B) Acetonitrila contendo 0,036% de TFA
- gradiente: de 5 a 95% de B em 30 minutos
- fluxo: 1,0 mL/minuto
- comprimento de onda do detector: 220 nm

- Escala Semipreparativa

A cromatografia líquida de alta eficiência, em escala semipreparativa, foi efetuada em um aparelho Beckman System Gold e Shimadzu LC-20AT. Os solventes utilizados foram todos de grau cromatográfico e a água empregada foi do tipo ultrapura.

No geral, as condições cromatográficas foram:

- coluna: fase reversa C18, Jupiter Phenomenex (250 x 10 mm); diâmetro da partícula = 15 µm; porosidade 300 Å
- solventes: A) Água contendo 0,045% de TFA
B) Acetonitrila contendo 0,036% de TFA
- gradiente: de 20 a 50% de B em 120 minutos
- fluxo: 4mL/minuto
- comprimento de onda do detector: 220 nm

Após o procedimento de purificação dos peptídeos, a caracterização das moléculas foi feita por meio de espectrometria de massas. As análises foram realizadas em modo de eletrospray positivo por injeção direta das amostras dos peptídeos puros em um espectrômetro de massas do tipo Ion Trap Amazon SL, da marca Brucker. Os valores de massa molecular experimental foram comparados com os valores teóricos calculados previamente para cada um dos peptídeos.

3.2.3. Ensaio enzimático

Os estudos para avaliação da inibição da atividade de superenovelamento do DNA promovido pela DNA girase e relaxamento do DNA promovido pela enzima topoisomerase IV, ambas as enzimas bacterianas, além de avaliação da inibição da atividade de relaxamento do DNA promovido pelas enzimas de origem humana topoisomerase I α e topoisomerase II α , foram realizados de acordo com o protocolo abaixo:

Uma unidade (U) de cada enzima foi incubada com 0,5 μ g de plasmídeo pBR322 relaxado ou superenovelado, dependendo da atividade específica de cada enzima. Adicionou-se também soluções dos análogos peptídicos sintetizados, em concentrações variadas, corrigindo com tampão de ensaio para um volume de reação de 30 μ L. A mistura foi então incubada em banho a 37 °C por 60 minutos.

Após o período, a reação foi interrompida pela adição de 3 μ L de SDS 2%, seguida de encubação durante 2 minutos a 62°C. Em seguida, foi adicionado 15 μ L de STEB, em todos os tubos e, também foi adicionado 60 μ L de uma mistura de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1). As amostras foram centrifugadas por 3 minutos a 7000 rpm e um volume de 15 μ L do sobrenadante de cada tubo foi aplicado no gel de agarose e submetidas à tensão constante de 60 V, à temperatura ambiente, por 60 minutos. Ao término da corrida, o gel foi corado durante 30 minutos em tampão de corrida, contendo brometo de etídio (50 mg/mL). O gel foi então examinado em transiluminador de luz ultravioleta incidente e fotografado em um Fotodocumentador Alpha Imager EP system da Alpha Innotech.

3.2.4. Preparação de lipossomas do tipo SUV por extrusão e avaliação da eficiência de encapsulação dos peptídeos

Os lipossomas do tipo SUV (small unilamellar vesicles) apresentando diâmetros próximos a 100 nm foram sintetizados através da metodologia de extrusão-evaporação de acordo com protocolos já desenvolvidos pelo grupo cuja metodologia é descrita a seguir.

Basicamente, as misturas de lipídeos correspondentes a cada uma das formulações de acordo com a **Tabela 1**, foram dissolvidas em clorofórmio em tubo

de vidro. O solvente foi evaporado lentamente, sob fluxo de nitrogênio, para possibilitar a formação de um fino filme lipídico na parede do tubo. Posteriormente, o excesso de solvente foi eliminado sob vácuo por aproximadamente 18 h.

Em seguida, o filme lipídico foi hidratado com tampão Tris HCl, 10 mM, pH 7,4 contendo os peptídeos em concentrações de 100 μ M. Para os estudos de eficiência de encapsulação, foi utilizado o peptídeo CcdBET-2 e CcdBSG-2.

Tabela 1 - Composição lipídica dos lipossomas inicialmente utilizada nos estudos*.

	DPPC	Chol	SA	PEG	PG
(+)Lipossoma	10	2	1	-	-
(PEG)Lipossoma	10	2	-	1	-
(Ø)Lipossoma	10	2	-	-	1
(+)Lipossoma sem colesterol	10	-	1	-	-

*Cada valor está expresso como uma proporção molar. DPPC=dipalmitoilfosfatidilcolina de soja; Chol=colesterol; SA=estearilamina; PEG=polietilenoglicol; PG=L α -palmitoil-glicerol

Fonte: Elaborado pela autora.

Para conseguir o desprendimento total do lipídeo das paredes do tubo, foram feitas agitações suaves (manualmente), alternadas com agitações vigorosas (mecanicamente em agitador tipo Vortex), obtendo desta forma uma suspensão de vesículas multilamelares grandes (MLV). Para obtenção de vesículas unilamelares pequenas (SUV), as MLV foram submetidas à extrusão (40 ciclos), utilizando extrusor equipado com filtro de policarbonato com poros de 100 nm de diâmetro.

A quantidade de ciclos de extrusão foi fixada a partir de protocolos previamente desenvolvidos, onde foi feito um acompanhamento do diâmetro dos lipossomas por espalhamento de luz obtido pelo equipamento Beckman Coulter (modelo N5), sendo as amostras previamente diluídas de modo a se obter um índice de polidispersão adequado (entre 10^4 e 10^6). A luz espalhada foi captada por um fotomultiplicador posicionado a 90° do feixe de laser que aumentou o sinal

captado e o enviou para um sistema correlator de onde os dados gerados foram para um computador. A temperatura foi mantida a 25°C e o comprimento de onda do laser foi de 520 nm. Nestas condições, o tamanho médio de 100 nm dos lipossomas foi obtido após 30 ciclos de extrusão, mantendo-se constante mesmo após 60 ciclos.

A eficiência de encapsulação do peptídeo de cada uma das diferentes formulações de lipossomas foi avaliada através de cromatografia líquida de média eficiência (CLME) equipado com coluna Superdex™ Pepitide (Pharmacia Biotech®), com fase móvel constituída de tampão Tris.HCl 10 mM, pH 7,4 com fluxo de eluição de 0,5 mL/min. Desta forma foram coletadas frações contendo lipossoma com peptídeo compartimentalizado, frações contendo somente peptídeos livres que não sofreram encapsulação e lipossomas vazios.

Após separação das frações, todas foram lidas em espectrofluorímetro Varian® modelo CaryEclipse, excitadas no comprimento de onda de 290 nm com varredura entre 300 a 500 nm, correspondente ao resíduo de triptofano contido na estrutura primária dos peptídeos estudados. Os valores de fluorescências obtidos foram comparados com uma curva padrão elaborada previamente para cada peptídeo estudado. Na elaboração da curva padrão foram utilizadas diferentes concentrações de CcdBET-2 e CcdBSG-2, sendo elas: 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12 µM e 6,25 µM.

3.2.5. Caracterização física dos lipossomas

Para que o ensaio fosse realizado, foram preparadas soluções de lipossoma de todas as formulações, o objetivo foi verificar se após os 40 ciclos de extrusão o tamanho médio das partículas realmente fica em torno de 100nm ou se devido a encapsulação dos análogos CcdBET-2 e CcdBSG-2 as partículas aumentavam de tamanho.

A análise de distribuição de tamanho e determinação do diâmetro médio dos lipossomas foi realizada através da técnica de espalhamento dinâmico de luz (light scattering), a qual fornece o raio hidrodinâmico de partículas coloidais, calculado pela equação de Einsten-Stokes. O cálculo é obtido pela equação de Einsten-Stokes: $D = Kt/6 \pi n R h$, onde K é a constante de Boltzmann, t a temperatura absoluta, η a viscosidade e Rh o raio hidrodinâmico. Esta técnica

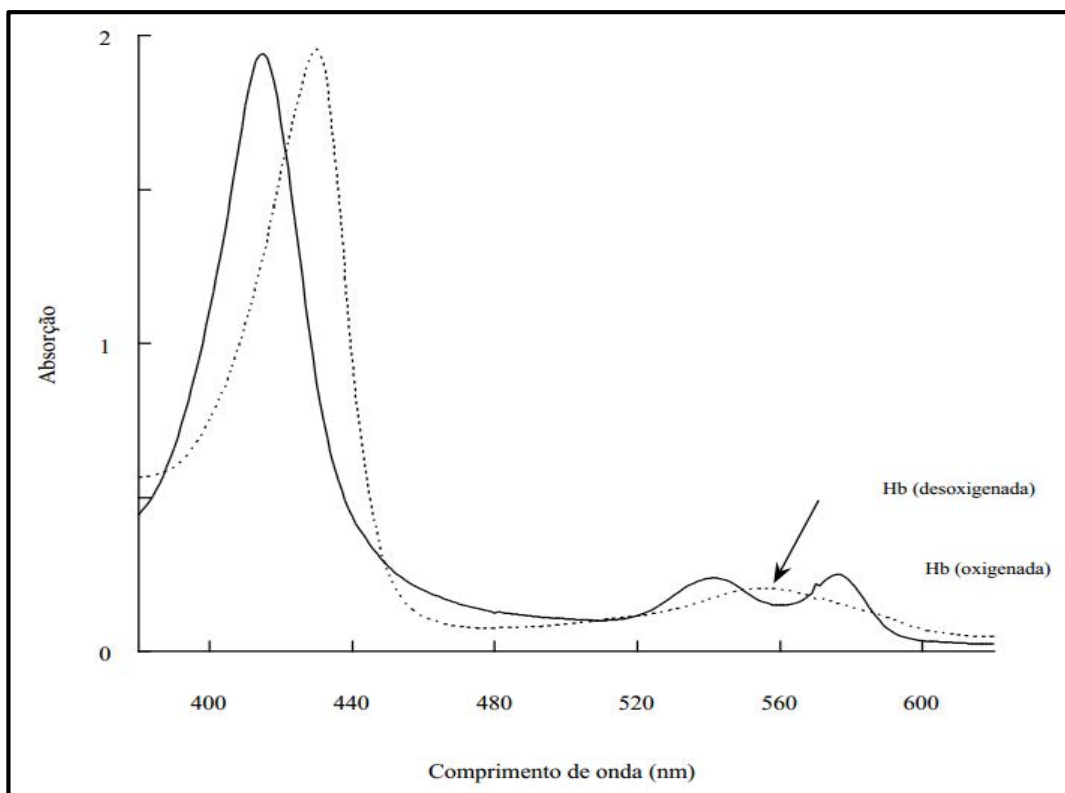
consiste em atravessar determinada amostra com um feixe de laser, de modo que as gotículas presentes no meio espalhem a luz. A luz espalhada é captada em sinal que é enviado ao correlator no qual é feito o processamento dos dados, que são processados em um software fornecendo os valores de diâmetro médio e índice de polidispersão (CHORILLI et al, 2007).

3.2.6. Ensaio de atividade hemolítica

Testes de atividade hemolítica dos peptídeos foram realizados com o intuito de investigar a toxicidade dos mesmos nas células eucarióticas. Para os testes foram utilizadas hemácias de sangue humano separadas do plasma por centrifugação e lavadas 3 vezes com tampão PBS (35 mmol.L⁻¹ fosfato de sódio; 0,15 mol.L⁻¹ de cloreto de sódio) pH 7,4. Uma suspensão celular a 2 % (v/v) e diluições seriadas dos peptídeos foram utilizadas na determinação da concentração hemolítica que lisa 50% das hemácias (HC₅₀) (volume final 200 µL: 100 µL da solução diluída do peptídeo e 100 µL da suspensão celular).

Depois da incubação a 37°C por 1 hora, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos e alíquotas de 100 µL do sobrenadante foram pipetadas em microplacas de 96 poços. A absorbância a 405 nm foi determinada para leitura da hemoglobina total (**Figura 16**) utilizando leitor de microplaca (BioTek, modelo Epoch). O valor de 100% de hemólise foi determinado utilizando 100 µL da suspensão celular misturada com 100 µL de Triton X-100 1% (v/v), enquanto que o valor de 0% de hemólise foi obtido utilizando 100 µL da suspensão celular com 100 µL de tampão PBS.

Figura 16 - Gráfico representativo da absorção de luz das formas oxidadas e não oxidadas da hemoglobina.



Fonte: Matos, 2003.

3.2.7. Ensaio de Viabilidade Celular

Os ensaios foram realizados para estudo da interação do lipossoma com a célula bacteriana além de verificar a atividade antimicrobiana dos peptídeos CcdBET-2 e CcdBSG-2 associados aos lipossomas.

Os ensaios foram realizados utilizando bactérias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*) e Gram negativas (*Escherichia coli* enterohemorrágica - EHEC).

Para o início do procedimento, foi reservado em um tubo de ensaio estéril, 7 mL de meio de cultura líquido (Mueller Hinton 22 g/L – Biolog MHB 10608).

Com uma alça de platina, flambada e resfriada à temperatura ambiente, foi dissolvido nos 7 mL de meio de cultura uma pequena alíquota de bactérias (repique recente - 24 horas). Tal alíquota foi coletada de uma cultura realizada em meio sólido (Agar bacteriológico - Acumedia). Após o meio turvo, a absorbância

foi medida num espectrofotômetro Kasuaki (Modelo IL-227) utilizando comprimento de onda de 600 nm (DO_{600nm}). A absorbância inicial obtida foi de 0,132 AU, dentro dos valores propostos (0,01 - 0,18) por Hengwei Wang e colaboradores (2010) que indicam a presença de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Como branco foi utilizado 1 mL de meio de cultura livre de suspensão de bactéria.

A suspensão de bactéria foi transferida para micro tubos de centrífuga para a realização do ensaio, obtendo-se, portanto, controle positivo, controle negativo, lipossoma branco em volumes diferenciados, lipossoma com peptídeo encapsulado e peptídeo livre em solução. Para as amostras de controle negativo de crescimento, o antibiótico Novobiocina (Sigma-N1628) e ciprofloxacina (Fluka – Sigma) foram utilizados numa contração de 100 μ M. Em seguida à adição dos compostos, as amostras foram colocadas em uma estufa com temperatura e agitação controladas (54 rpm/37°C) por um período de 3 horas.

Para avaliação da atividade antimicrobiana dos sistemas lipossomais contendo os peptídeos encapsulados, utilizou-se a reação de redução do composto MTT e formação dos cristais de formazan, a partir de protocolo baseado em Hengwei Wang e colaboradores (2010). Para isto, 20 μ L de MTT foram adicionados em cada micro tubo. As amostras foram novamente colocadas na estufa, com a mesma agitação e temperatura, porém, o tempo foi reduzido para 15 minutos. Ao término de incubação, os micro tubos foram centrifugados à 10.000 RPM – 20/30 segundos, o sobrenadante foi retirado cuidadosamente e os cristais foram ressuspensos com 500 μ L de DMSO e agitados manualmente até a dissolução completa dos cristais. A suspensão foi transferida para tubos de ensaio estéreis e em cada tubo foi adicionado mais 2000 μ L de DMSO, obtendo-se um volume final de 2500 μ L. Para que houvesse a dissolução completa dos cristais de formazan, foi necessário deixar a suspensão reagindo durante 10 minutos em temperatura ambiente.

Ao término da reação, foi feita a leitura das absorbâncias a 550 nm das suspensões de cada tubo de ensaio num espectrofotômetro utilizando DMSO como branco.

4. Resultados e Discussão

4.1. Rendimento das sínteses dos peptídeos

Inicialmente, partiu-se de 1,0 g de uma resina Fmoc-Ile-Wang (0,69 mmol/g) e DIC/HOBt como agentes de condensação para o acoplamento dos resíduos de aminoácidos de cada um dos análogos, conforme esquema apresentado na **Figura 17**.

Após desproteção do primeiro aminoácido, iniciou-se o acoplamento dos demais, seguindo sempre os passos de lavagens e desproteções, apresentados na **Figura 12**, seguindo as condições descritas no item **3.2.1**.

Após a síntese do composto primário, a massa de peptidil-resina (2,47 g) foi dividida em duas frações de aproximadamente 1,2 g cada, para prosseguimento da síntese das diferentes sequencias (análogos CcdBET-2 e CcdBSG-2), separadamente.

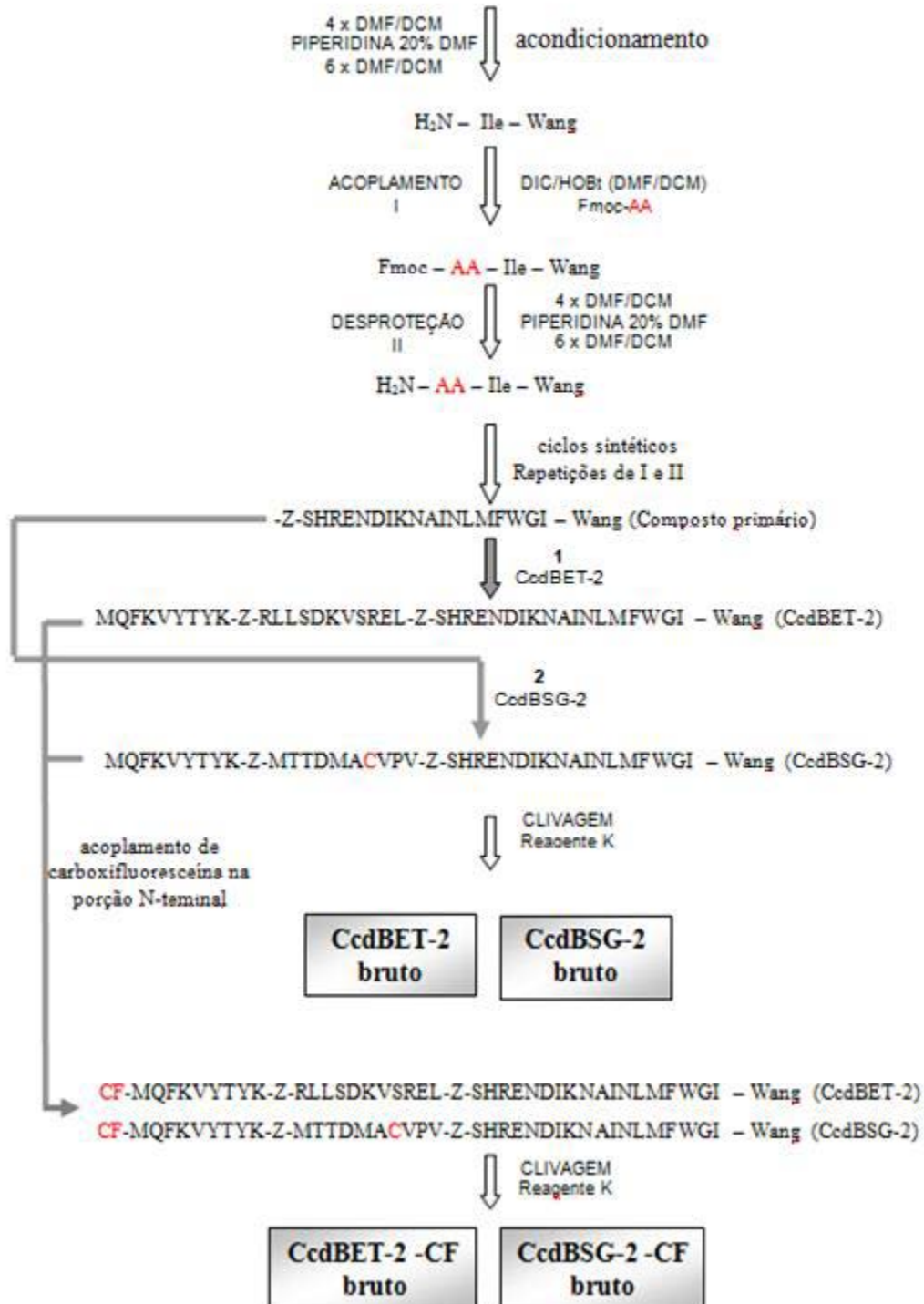
Após o acoplamento do último aminoácido de cada peptídeo, foi separado uma pequena porção de aproximadamente 500 mg da peptidil-resina correspondente a cada um dos análogos, para o devido acoplamento do marcador fluorescente carboxifluoresceína (CF) na extremidade N-terminal para formação dos análogos CcdBET-2-CF e CcdBSG-2-CF. As massas de peptidil-resina obtidas no final da síntese de cada um dos análogos podem ser observadas na **Tabela 2**. Ao final, todos análogos foram clivados da resina, precipitados, extraídos e liofilizados de acordo com o protocolo descrito no item **3.2.1**.

Tabela 2 - Massas de peptidil-resinas de cada um dos análogos sintetizados.

Análogo	Massa final de peptidilresina (g)
CcdBET-2	1,88
CcdBET-2-CF	0,71
CcdBSG-2	1,77
CcdBSG-2-CF	0,63

Fonte: Elaborado pela autora

Figura 17 - Esquema da síntese dos análogos peptídicos de CcdB.

Fmoc-Ile-Wang (suporte polimérico)

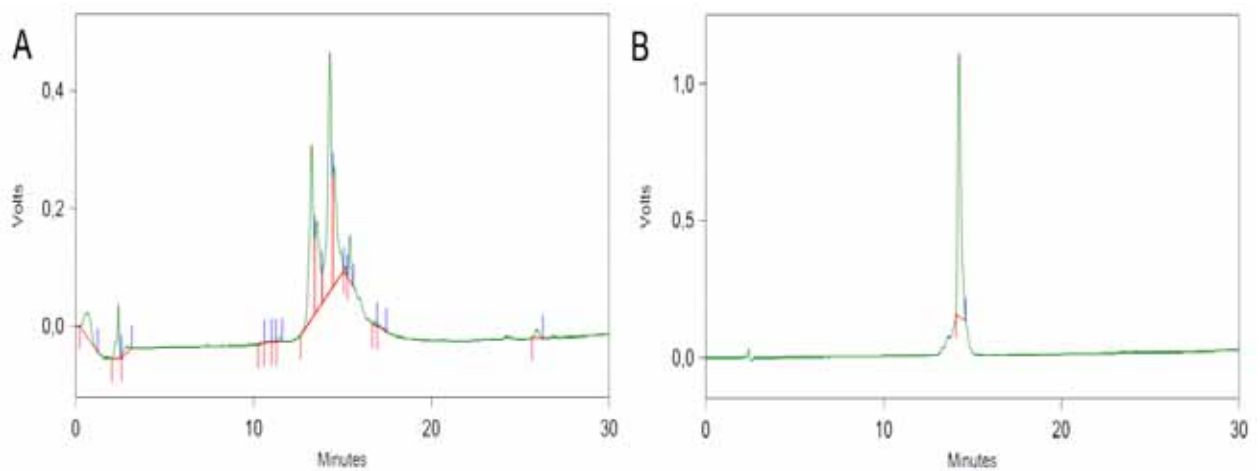
Fonte: Adaptado de Garrido (2007).

4.2. Purificação e caracterização dos peptídeos

Após o procedimento de clivagem uma fração da massa do extrato bruto de cada peptídeo liofilizado, aproximadamente 50 mg, foi dissolvido em cerca de 5 mL de solvente A (água + TFA 0,036%), com adição de pequenos volumes de acetonitrila para auxiliar na solubilização completa do material bruto. A solução resultante deste processo foi então submetida à análise qualitativa em CLAE, sob condições já descritas anteriormente.

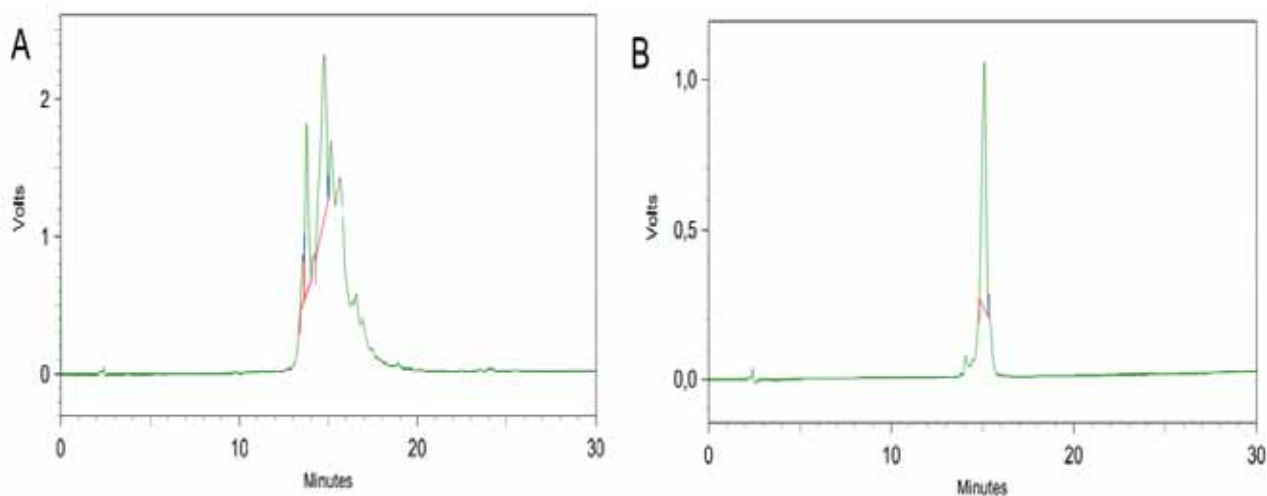
A partir dos resultados de tempo de retenção e porcentagem de solvente obtidos nestas análises, foram definidas as condições relativas à concentração de solvente para purificação dos peptídeos em escala semi-preparativa (condições descritas no item 3.2.2). Os cromatogramas obtidos antes e após processo de purificação estão representados nas figuras (**Figura 18**, **Figura 19**, **Figura 20** e **Figura 21**).

Figura 18 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE, em escala analítica, para o análogo peptídico CcdBET-2, antes (A) e após purificação (B).



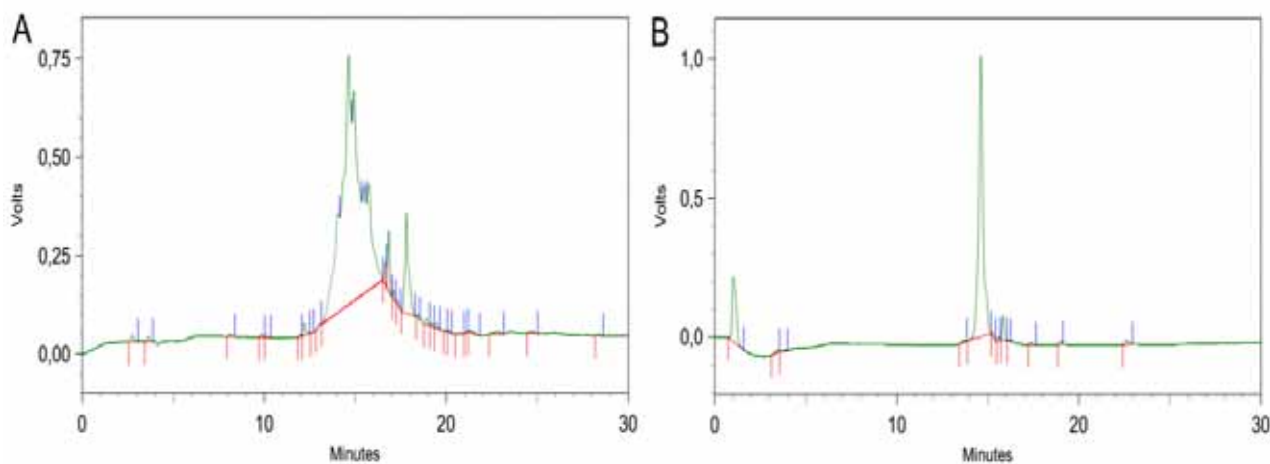
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 19 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE, em escala analítica, para o análogo peptídico CcdBSG-2, antes (A) e após purificação (B).



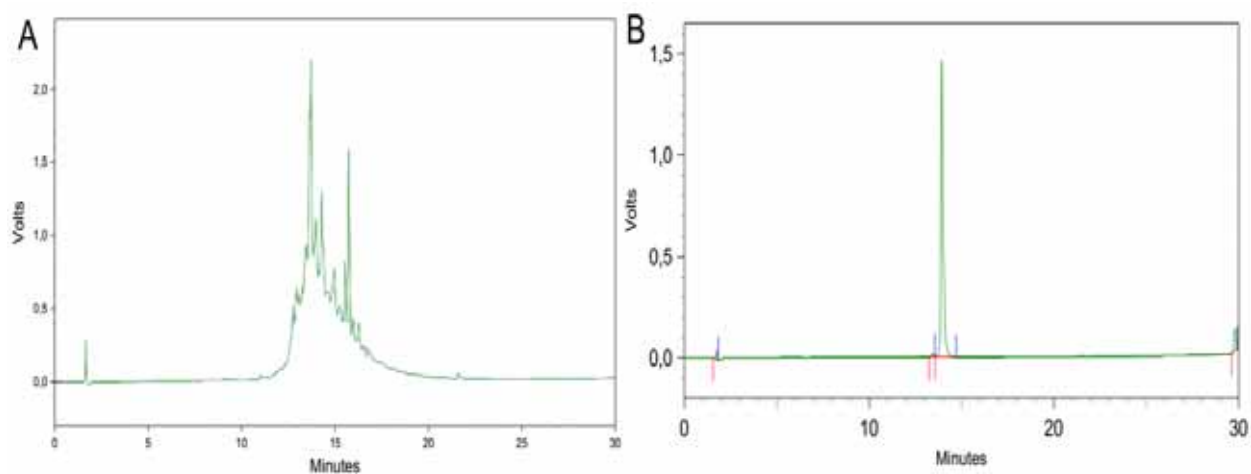
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 20 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE, em escala analítica, para o análogo peptídico CcdBET-2-CF, antes (A) e após purificação (B).



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 21 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE, em escala analítica, para o análogo peptídico CcdBSG-2-CF, antes (A) e após purificação (B).



Fonte: Elaborado pela autora.

Os perfis cromatográficos dos análogos de CcdB puros, apresentaram um único pico em relação aos cromatogramas observados a partir da análise do extrato bruto. O parâmetro tempo de retenção dos análogos purificados foi mantido em relação ao pico que corresponde aos respectivos análogos de *CcdB* no extrato bruto.

A caracterização dos peptídeos foi realizada através de ensaios de espectrometria de massas. Os valores de massa molecular, obtidos por espectrometria de massas no modo electrospray positivo [ES m/z : (M + H)⁺], apresentados na **Tabela 3**, foram coincidentes com o teórico esperado.

Tabela 3 - Massas moleculares teóricas e obtidas por espectrometria de massas dos análogos peptídicos sintetizados.

Análogo peptídico	Massa molecular	
	teórica (g/mol)	ES m/z (MW)
CcdBET-2	4871	4871
CcdBSG-2	4623	4623
CcdBET-2-CF	5229	5229
CcdBSG-2-CF	4981	4981

Fonte: Elaborado pela autora.

Conforme os valores de massas obtidas no espectrômetro de massas, foi possível comprovar o sucesso das sínteses e de obtenção dos peptídeos desejados.

4.3. Preparação dos lipossomas do tipo SUV por extrusão e estudos de encapsulação dos peptídeos

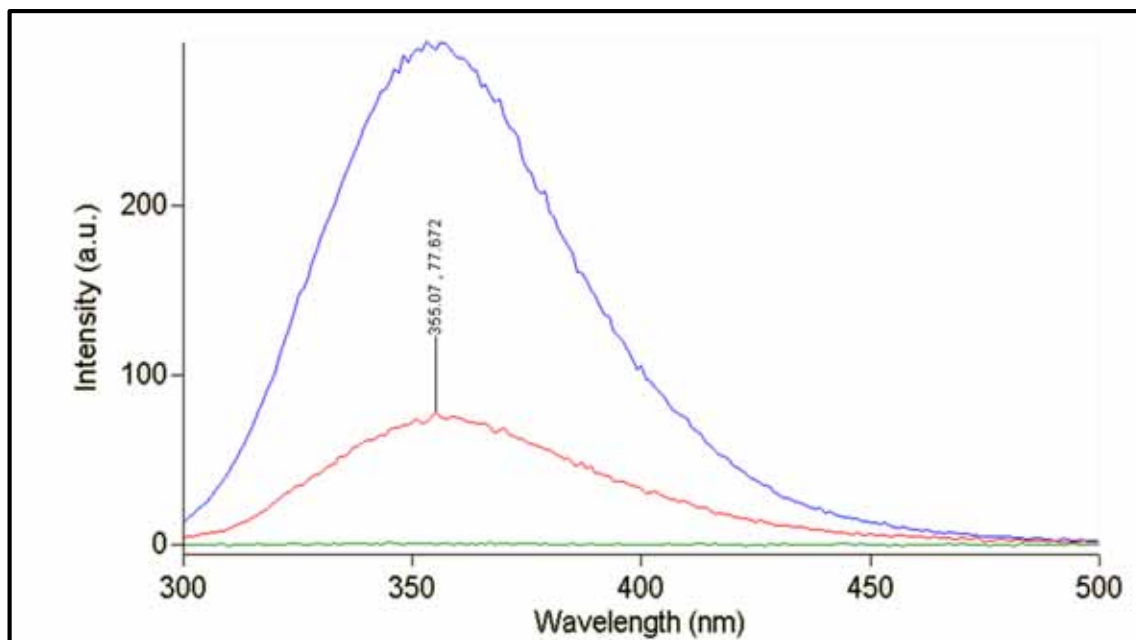
Foi observado durante a preparação, que os filmes ficaram com consistência viscosa, homogênea e translúcida conforme o esperado sendo, portanto, estabelecidas as proporções de componentes apresentadas na **Tabela 1** para os testes subsequentes.

O processo de elaboração das vesículas lipossomais e encapsulação dos peptídeos CcdBET-2 e CcdBSG-2, deu-se empregando a técnica de extrusão-
evaporação dos filmes como na metodologia descrita em material e métodos. Após o preparo de cada formulação, estudos de eficiência de encapsulação foram realizados utilizando uma associação de técnicas cromatográficas e espectrofotométricas.

A Cromatografia de filtração e gel foi utilizada para separar as frações contendo lipossomas com peptídeo compartimentalizados das frações contendo apenas peptídeo não encapsulado livre em solução e lipossomas vazios. Em seguida, através da técnica de espectrofluorimetria, as frações foram analisadas uma a uma, a fim de quantificar por fluorescência, a quantidade de peptídeo que restou livre em solução, isto é, que não foi encapsulado nos lipossomas. Isto é possível devido ao fato dos peptídeos apresentarem o aminoácido triptofano em suas estruturas. O triptofano, por ser um aminoácido aromático, possui a característica de absorver energia a um comprimento de onda de 280 nm e emitir fluorescência num comprimento de onda em torno de 350-360 nm. Isto permite analisarmos quantitativamente a eficiência do método de encapsulação desses peptídeos para cada composição de lipossomas.

Podemos exemplificar este comportamento através da análise da **Figura 22** a qual representa um experimento demonstrativo do comportamento do espectro de emissão de fluorescência dos sistemas estudados.

Figura 22 - Curva de emissão de fluorescência para uma solução de concentração 100 μM de CcdBET-2 livre (azul); solução contendo lipossomas com peptídeo livre (vermelho); solução contendo somente lipossomas com peptídeo encapsulado (verde).

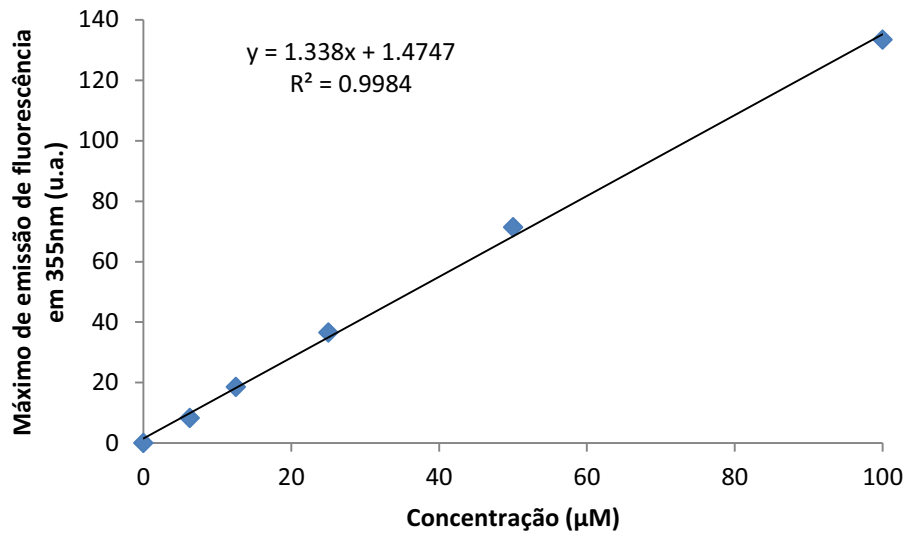


Fonte: Elaborado pela autora.

É possível observar que nas frações contendo lipossomas com peptídeo encapsulado (ou compartimentalizado), não há emissão de fluorescência correspondente ao resíduo de triptofano (comportamento da curva em verde). Este fato pode ser explicado pela supressão do sinal de fluorescência deste aminoácido pela micela lipídica dos lipossomas. Já nas frações onde há peptídeo não encapsulado e, portanto, livre em solução, podemos observar uma considerável emissão de fluorescência correspondente ao triptofano (curva em vermelho). No entanto, o máximo de emissão de fluorescência do peptídeo que não foi encapsulado é visivelmente menor que a fluorescência de uma solução de peptídeo na concentração de 100 μM , a qual foi utilizada no procedimento de preparo dos lipossomas (curva azul).

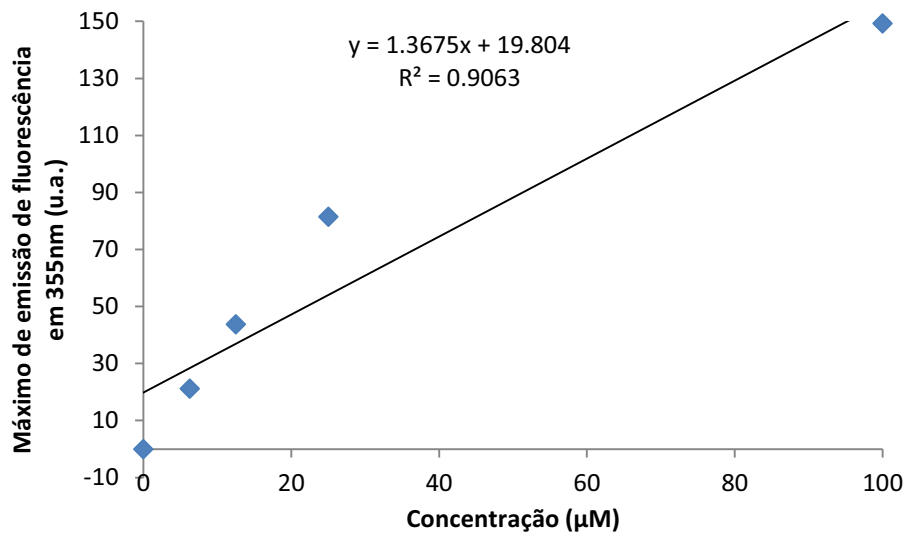
Para análise quantitativa entre as frações obtidas em cada ensaio, foi elaborada uma curva padrão de emissão máxima de fluorescência para cada análogo utilizando soluções de diferentes concentrações do peptídeo correspondente (**Figura 23** e **Figura 24**).

Figura 23 - Curva padrão obtida pela emissão máxima de fluorescência de soluções de CcdBET-2 em diferentes concentrações.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 24 - Curva padrão obtida pela emissão máxima de fluorescência de soluções de CcdBSG-2 em diferentes concentrações.



Fonte: Elaborado pela autora.

Conforme proposto, foram produzidas quatro composições diferentes de lipossomas em termos de características de carga efetiva da camada lipídica, no qual foram obtidos resultados específicos de eficiência de encapsulação para cada uma delas conforme demonstrado a seguir.

A formulação do lipossoma com carga efetiva (+), por exemplo, é composta por dipalmitoilfosfatidilcolina de soja, colesterol e estearilamina na proporção 10:2:1 (**Tabela 1**). A estearilamina foi adicionada a esta formulação com a intenção de proporcionar caráter positivo a esta vesícula, pois, sendo um lipídeo catiônico que apresenta um $pK_a=10,6$ em pH fisiológico, o mesmo confere carga positiva às vesículas lipossomais no pH de preparo das formulações (pH 7,4).

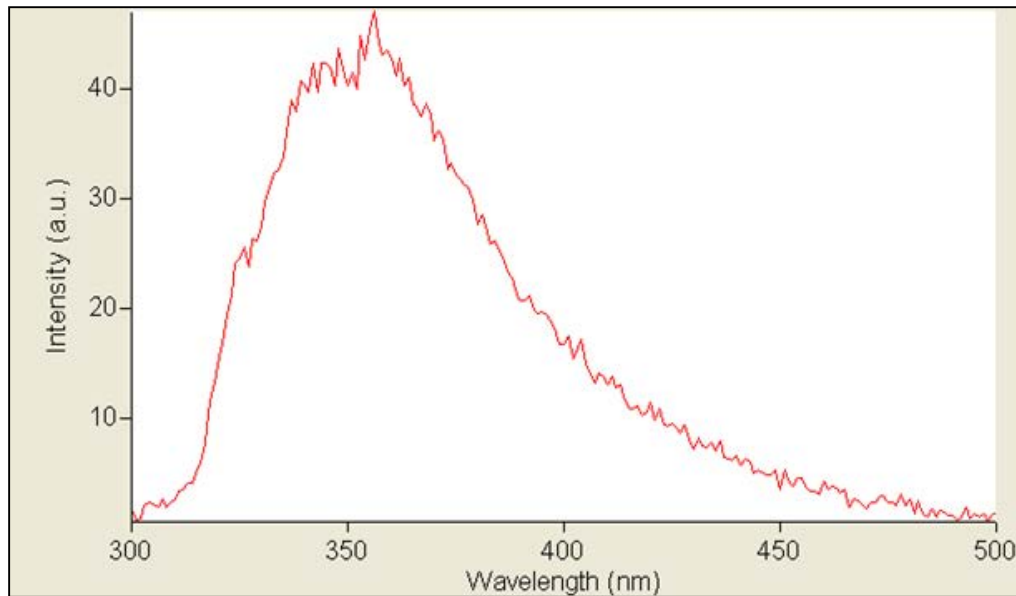
Após a formulação do filme lipídico, a ressuspensão foi feita com solução 100 μM de cada peptídeo, preparada em tampão Tris.HCl 10mM, pH 7,4. Em seguida a solução foi passada em aparelho extrusor por 40 ciclos e a solução resultante submetida a teste de eficiência de encapsulação. Após a separação em coluna de gel filtração, obteve-se 13 frações que foram analisadas por fluorescência.

As frações 11 e 12 correspondem às frações com o peptídeo livre, que não sofreu encapsulação total, já que pudemos observar um valor de emissão de fluorescência significativo por volta de 360 nm, correspondendo ao sinal do resíduo de triptofano (**Figura 25**).

A eficiência do teste foi feita através da dosagem das frações com peptídeo livre comparativa à curva padrão, pois, conhecendo a quantidade de peptídeo que não encapsulou, temos indiretamente a quantidade que está associado às vesículas lipossomais.

No caso do experimento correspondente à **Figura 25**, o qual foi realizado para o peptídeo CcdBET-2, a intensidade máxima de fluorescência obtido foi de 47,040 (unidades arbitrárias - a.u.). Comparando este valor com o a curva padrão de fluorescência para este peptídeo (**Figura 23**), podemos concluir que a quantidade de peptídeo livre em solução que não sofreu encapsulação é aproximadamente 48% comparado com todo o peptídeo que foi utilizado na solução de ressuspensão para o preparo desses lipossomas (100 μM). Sendo assim, indiretamente podemos concluir que a eficiência de encapsulação desse sistema foi em torno de 52%.

Figura 25 - Espectro de emissão de fluorescência das frações 11 e 12 após separação em coluna de gel filtração da formulação de lipossoma positiva(+). Comprimento de onda de excitação: 290 nm; Faixa de varredura de emissão de fluorescência: 300 - 500 nm.



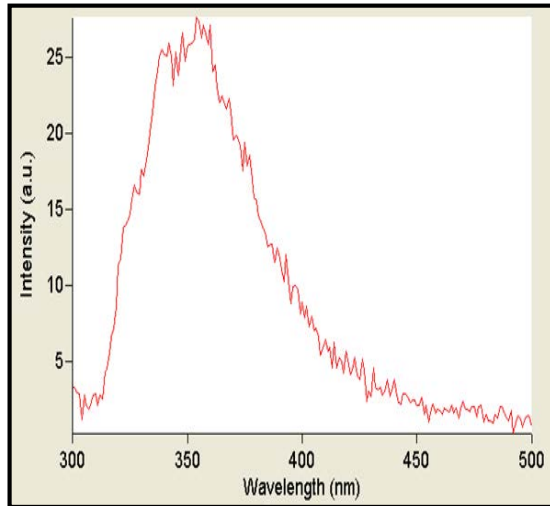
Fonte: Elaborado pela autora.

Este raciocínio foi utilizado para a avaliação da eficiência de encapsulação das demais formulações estudadas. A **Figura 26** mostra os espectros de fluorescência das frações contendo o peptídeo CcdBET-2 livre para cada uma das formulações desenvolvidas.

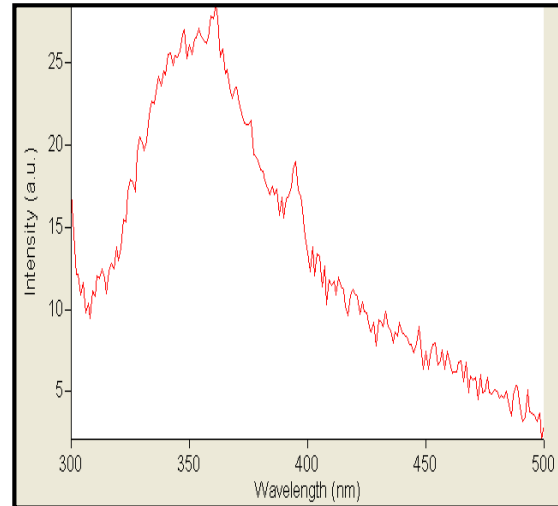
A **Tabela 4** contém os resultados de eficiência de encapsulação do peptídeo CcdBET-2 para cada uma das formulações de lipossomas sintetizadas neste trabalho.

Para lipossoma contendo PEG, o resultado observado é bastante interessante. Este composto na composição da vesícula confere uma maior estabilidade em meio fisiológico. Além disso, podemos observar que mesmo as formulações positivas apresentaram boas eficiências de encapsulação, Este fato é interessante pois esperávamos que CcdBET-2, por possuir carga global positiva (+3,1) em pH fisiológico, apresentaria dificuldade de incorporação nestas formulações.

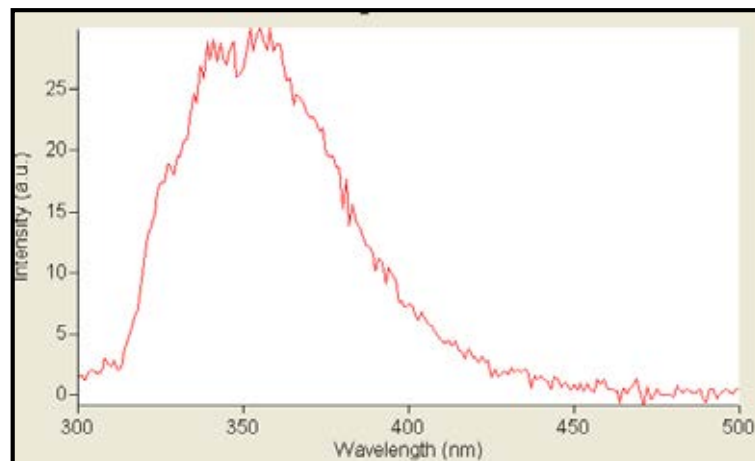
Figura 26 - Espectro de emissão de fluorescência das frações correspondentes a lipossomas de diferentes formulações contendo o peptídeo CcdBET-2 não encapsulado. Abaixo de cada espectro está a formulação correspondente e o valor máximo de emissão de fluorescência. Comprimento de onda de excitação: 290 nm; Faixa de varredura de emissão de fluorescência: 300 - 500 nm.



PEG (27,875 a.u.)



Neutro (28,554 a.u.)



Positivo sem colesterol (29,964 a.u.)

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 4 - Comparação dos resultados de eficiência de encapsulação obtidos para o peptídeo CcdBET-2 para as diferentes formulações de lipossomas.

Peptídeo	Formulações dos lipossomas			
	Lipossoma (+)	Lipossoma (PEG)	Lipossoma (Ø)	Lipossoma (+) *
CcdBET-2	52%	71%	70%	68%

*sem colesterol

Fonte: Elaborado pela autora.

Para o peptídeo CcdBSG-2, os mesmos ensaios de eficiência de encapsulação foram feitos para cada uma das formulações de lipossomas. A **Tabela 5** contém os resultados de eficiência de encapsulação dos dois peptídeos estudados para cada uma das formulações de lipossomas facilitando assim a comparação dos resultados em cada caso.

Tabela 5 - Comparação dos resultados de eficiência de encapsulação obtidos para os peptídeos CcdBSG-2 e CcdBET-2 para as diferentes formulações de lipossomas.

Peptídeo	Formulações dos lipossomas			
	Lipossoma (+)	Lipossoma (PEG)	Lipossoma (Ø)	Lipossoma (+) *
CcdBSG-2	75%	65%	75%	62%
CcdBET-2	52%	71%	70%	68%

*sem colesterol

Fonte: Elaborado pela autora.

De modo geral, o valor de eficiência de encapsulação para o peptídeo CcdBET-2 foi ligeiramente diferente comparado ao CcdBSG-2 para a formulação positiva (+). Apesar de ser estruturalmente semelhante ao CcdBET-2, o peptídeo CcdBSG-2 contém uma região (resíduos 64 ao 73) diferente. Esta diferença confere ao CcdBET-2 uma carga global muito mais positiva (+3,1) do que o CcdBSG-2 com carga de (+1) em pH fisiológico. Essa diferença de cargas

influencia diretamente na eficiência de encapsulação, dando indícios de quanto mais carga (no caso positiva), mais difícil é a encapsulação neste tipo de composição lipossomal. No entanto, na ausência de colesterol, este comportamento é minimizado. Esta observação é bastante importante, pois o colesterol é um componente que confere maior rigidez à membrana lipossomal. O aumento dessa rigidez pode estar relacionado com a maior dificuldade de encapsulação dos peptídeos.

Para lipossoma contendo PEG, os resultados para o CcdBSG-2 também foram bastante interessantes, lembrando que este componente confere maior estabilidade e elasticidade ao lipossoma. Essa característica aparentemente é responsável por uma maior facilidade na encapsulação dos peptídeos estudados, principalmente quando comparamos os resultados alcançados para a formulação contendo colesterol.

A formulação neutra contém uma composição lipídica que confere ao lipossoma uma carga residual neutra. Esta característica levou a um grau de incorporação relativamente melhor e próximo para ambos os peptídeos.

Acreditamos que foi dado um grande avanço na metodologia proposta para avaliação da eficiência de encapsulação de peptídeos em lipossomas, porém muito há de ser aprimorado e ajustado para que a confiabilidade desse método seja a maior possível.

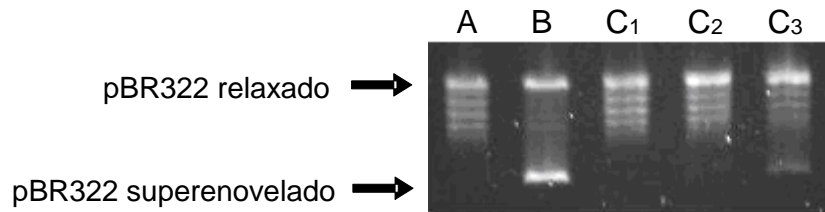
4.4. Ensaio de inibição enzimática

4.4.1. Enzimas bacterianas DNA girase e topoisomerase IV

A inibição da reação de superenovelamento catalisada pela DNA girase e de relaxamento catalisada pela topoisomerase IV, ambas enzimas bacterianas, pelos análogos peptídicos do CcdB, foi analisada através de eletroforese em gel de agarose, de acordo com procedimento descrito no item **3.2.3**. A **Figura 27** e a **Figura 28** mostram as análises referentes ao análogo CcdBET-2 para cada uma das enzimas bacterianas.

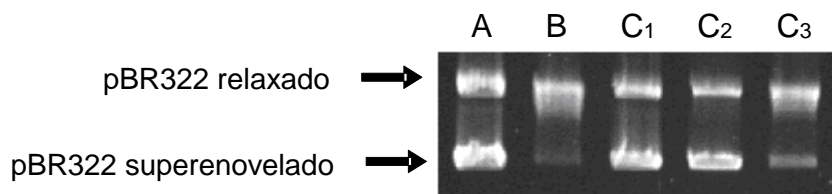
Podemos observar que para este análogo, houve inibição da atividade de ambas as enzimas a uma concentração próxima de 25 μM , quando comparado com a atividade da enzima (controles positivos representados na linha B de ambas as figuras).

Figura 27 - Inibição da atividade de superenovelamento da DNA girase pelo CcdBET-2. Volume de reação de 30 μ L contendo: (linha **A**) plasmídeo pBr322 relaxado controle; (linha **B**) plasmídeo pBr322 relaxado e DNA girase (1U) na ausência de inibidor; (linhas **C**) plasmídeo pBR322 relaxado, DNA girase (1U) e o análogo CcdBET-2. Os números 1, 2 e 3 correspondem às concentrações ensaiadas de 100, 50 e 25 μ mol/L.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 28 - Inibição da atividade de relaxamento da topoisomerase IV pelo CcdBET-2. Volume de reação de 30 μ L contendo: (linha **A**) plasmídeo pBr322 superenovelado controle; (linha **B**) plasmídeo pBr322 superenovelado e topoisomerase IV (1U) na ausência de inibidor; (linhas **C**) plasmídeo pBR322 superenovelado, topoisomerase IV (1U) e o análogo CcdBET-2. Os números 1, 2 e 3 correspondem às concentrações ensaiadas de 100, 50 e 25 μ mol/L.



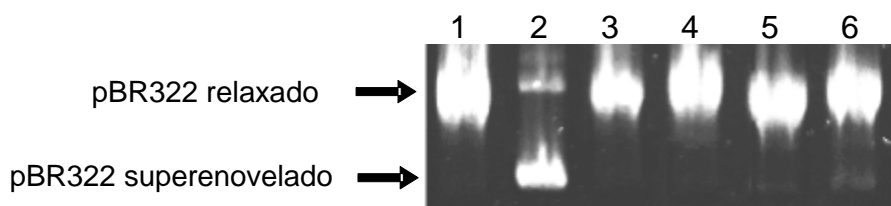
Fonte: Elaborado pela autora.

Embora intimamente relacionada com a DNA girase, a topoisomerase IV preferencialmente catalisa reações distintas. Neste contexto, a capacidade de inibir a atividade de ambas as enzimas, a uma mesma concentração, como é o caso do análogo CcdBET-2, é um fato inédito, especialmente por se tratar de um análogo da toxina natural CcdB, cuja atividade inibitória foi descrita apenas para DNA girase em concentração superior da encontrada por este análogo (SMITH & MAXWELL, 2006). Valores inferiores foram alcançados por estes mesmos autores, somente após a redução da concentração da enzima de 20 (1U) para 1,5 nmol/L (0,1U). Neste caso, a mínima concentração para inibição obtida foi de 10 μ mol/L para a DNA girase.

O mesmo tipo de ensaio foi realizado para o análogo CcdBSG-2. Na **Figura 29**, é possível observar que a inibição da atividade da DNA girase é

atingida a uma concentração próxima a 15 μM , um valor ainda menor ao demonstrado pelo análogo CcdBET-2.

Figura 29 - Inibição do superenovelamento do DNA pelo CcdBSG-2. Volume de reação 30 μL ; ensaios contendo plasmídeo pBR322 relaxado (0,5 μg) e girasse (1U). (Coluna 1), pBR322 relaxado controle; (coluna 2) plasmídeo pBr322 relaxado e DNA girase (1U) na ausência de inibidor; (colunas 3-6), contendo o análogo CcdBSG-2 nas concentrações de 90, 30, 15 e 10 μM .

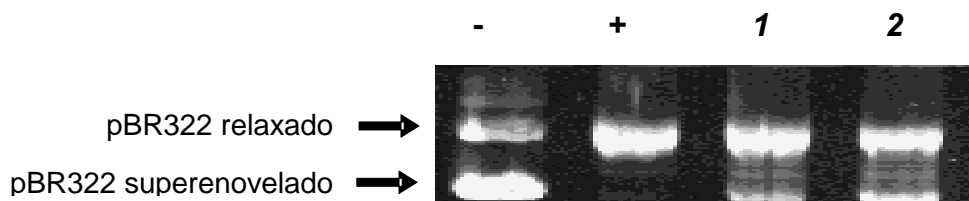


Fonte: Elaborado pela autora.

A concentração de 15 μM , para CcdBSG-2, equivalente a 70 $\mu\text{g/mL}$, corresponde a um valor inferior aquele citado por Bernard e colaboradores (1992), para a inibição da atividade da DNA girase, utilizando CcdB natural de *Escherichia coli* (100 $\mu\text{g/mL}$). Este resultado é bastante surpreendente, pois evidencia que as sequências escolhidas e mantidas no análogo, foram suficientes para a manutenção das características estruturais responsáveis pela atividade inibitória do CcdB natural para esta enzima.

Utilizando esta concentração inibitória de 15 μM , foi realizado um ensaio de inibição da atividade da topoisomerase IV, cujo resultado é demonstrado na **Figura 30**.

Figura 30 - Inibição da atividade de relaxamento da topoisomerase IV pelo CcdBSG-2. Volume de reação de 30 μL contendo: (linha -) plasmídeo pBr322 superenovelado controle; (linha +) plasmídeo pBr322 superenovelado e topoisomerase IV (1U) na ausência de inibidor; (linhas 1 e 2) plasmídeo pBR322 superenovelado, topoisomerase IV (1U) e o análogo CcdBSG-2 na concentração 15 $\mu\text{mol/L}$ - ensaio em duplicata.



Fonte: Elaborado pela autora.

HASHIMI e colaboradores em 2007 realizaram alguns estudos empregando a albicidina, único inibidor da topoisomerase IV relatado até então na literatura. Comparando os resultados de inibição do peptídeo CcdBSG-2 obtidos em estudos anteriores feitos pelo grupo de pesquisa com os observados para a albicidina (0,5 µg/mL), pode-se observar que o CcdBSG-2 apresenta uma capacidade inibitória frente a esta enzima em concentrações que correspondem a 0,1 µg/mL. Isto significa dizer que CcdBSG-2 é cerca de 5 vezes mais potente que albicidina na inibição de topoisomerase IV.

Os ensaios mostrados acima, mostram a inibição das enzimas Topoisomerase IV e DNA girase, utilizando os peptídeos CcdBET-2 e CcdBSG-2. Porém, os peptídeos utilizados não possuíam carboxifluoresceína.

Após o acoplamento do marcador fluorescente carboxifluoresceína na extremidade amino-terminal dos peptídeos, foi realizado um ensaio de eletroforese para avaliar se os compostos continuariam com ação de inibição sob as enzimas bacterianas.

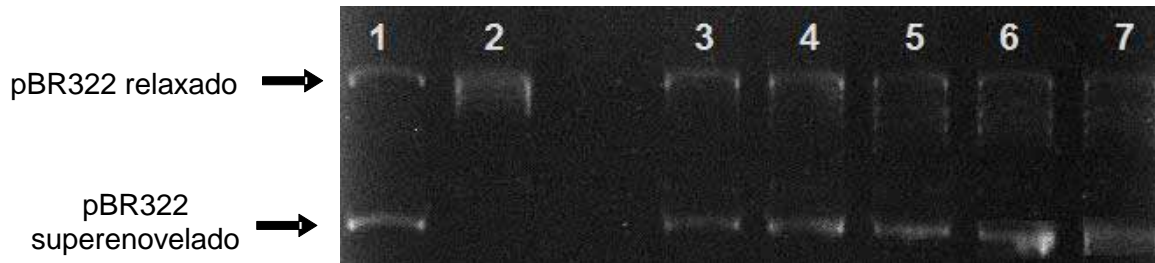
Os ensaios de inibição da enzima topoisomerase IV, mostraram que mesmo com o acoplamento da carboxifluoresceína, os peptídeos CcdBET-2 e CcdBSG-2 são capazes de inibir esta enzima (**Figura 31 e Figura 32**).

Figura 31 - Ensaio de inibição enzimática com o análogo CcdBSG-2 com carboxifluoresceína em topoisomerase IV. Em **1** tem-se o controle negativo, onde o plasmídeo encontra-se superenovelado, sem ação da topoisomerase IV; em **2** tem-se o controle positivo, onde o plasmídeo está sob ação da enzima; **3-7** tem-se o plasmídeo em contato com a enzima e CcdBSG-2 nas concentrações, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 15 µM e 5 µM respectivamente.



Fonte: Elaborado pela autora.

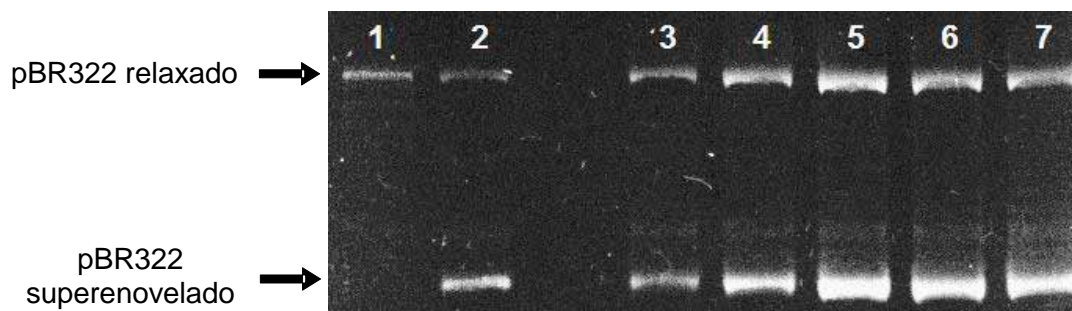
Figura 32 - Ensaio de inibição enzimática com o análogo CcdBET-2 com carboxifluoresceína em topoisomerase IV. Em **1** tem-se o controle negativo, onde o plasmídeo encontra-se superenovelado, sem ação da topoisomerase IV; em **2** tem-se o controle positivo, onde o plasmídeo está sob ação da enzima; **3-7** tem-se o plasmídeo em contato com a enzima e CcdBET-2 nas concentrações, 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 15 μ M e 5 μ M respectivamente.



Fonte: Elaborado pela autora.

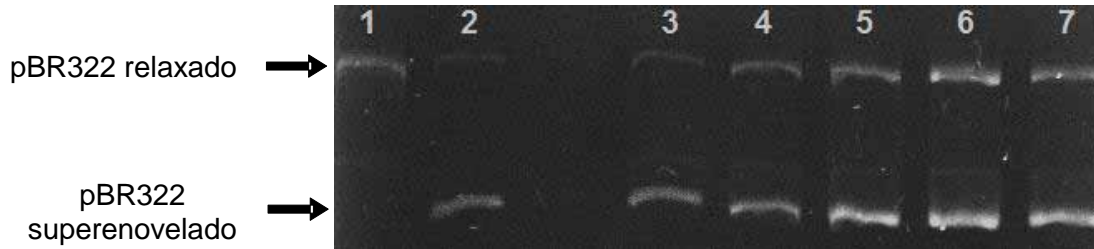
Por outro lado, os resultados dos ensaios de inibição da enzima DNA girase mostraram que, após o acoplamento da sonda fluorescente, os análogos perderam a ação inibitória, possivelmente devido à perda de estruturas secundária e terciária, devido à presença de uma molécula relativamente complexa na subunidade amino-terminal de cada um dos peptídeos (**Figura 33** e **Figura 34**).

Figura 33 - Ensaio de inibição enzimática com o análogo CcdBSG-2 com carboxifluoresceína em DNA Girase. Em **1** tem-se o controle negativo, onde o plasmídeo encontra-se relaxado, sem ação DNA Girase; em **2** tem-se o controle positivo, onde o plasmídeo está sob ação da enzima; **3-7** tem-se o plasmídeo em contato com a enzima e CcdBSG-2 nas concentrações, 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 15 μ M e 5 μ M respectivamente.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 34 - Ensaio de inibição enzimática com o análogo CcdBET-2 com carboxifluoresceína em DNA Girase. Em **1** tem-se o controle negativo, onde o plasmídeo encontra-se Relaxado, sem ação DNA Girase; em **2** tem-se o controle positivo, onde o plasmídeo está sob ação da enzima; **3-7** tem-se o plasmídeo em contato com a enzima e CcdBET-2 nas concentrações, 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 15 μ M e 5 μ M.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.4.2. Enzimas humanas topoisomerase I e topoisomerase II α

Um estudo adicional relacionado à possibilidade de haver ação tóxica dos análogos peptídicos utilizados neste trabalho em células humanas, o que seria um ponto negativo para a aplicação clínica dos mesmos. Para isso, foram realizados ensaios de inibição enzimática com as enzimas topoisomerases humanas (topoisomerase I e topoisomerase II α).

Assim como a topoisomerase IV bacteriana, as topoisomerases humanas citadas possuem a função de relaxamento do DNA. Sendo assim, as enzimas em contato com um DNA superenovelado, tende a torná-lo relaxado. Na **Figura 35** e na **Figura 36** são apresentados os resultados referentes a cada um dos análogos frente à atividade da topoisomerase II α .

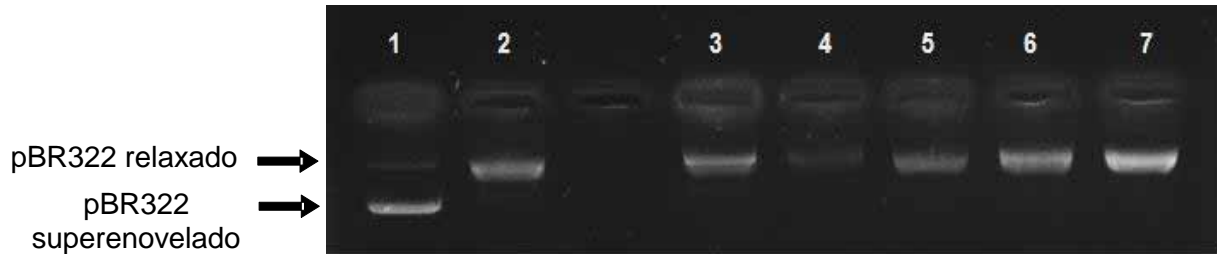
Figura 35 - Ensaio enzimático com o análogo CcdBET-2 em topoisomerase II α humana.

Em **1** tem-se o controle negativo, onde o plasmídeo encontra-se superenovelado, sem ação da topoisomerase II α ; em **2** tem-se o controle positivo, onde o plasmídeo está sob ação da topoisomerase II α ; **3-7** tem-se o plasmídeo em contato com a enzima e CcdBET-2 nas concentrações 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 15 μ M e 5 μ M respectivamente.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 36 - Ensaio de inibição enzimática com o análogo CcdBSG-2 em topoisomerase II α humana. Em **1** tem-se o controle negativo, onde o plasmídeo encontra-se superenovelado, sem ação da topoisomerase II α ; em **2** tem-se o controle positivo, onde o plasmídeo está sob ação da topoisomerase II α ; **3-7** tem-se o plasmídeo em contato com a enzima e CcdBSG-2 nas concentrações, 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 15 μ M e 5 μ M.



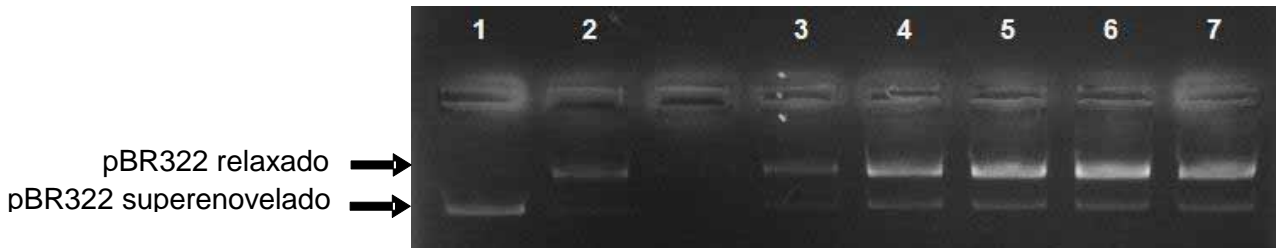
Fonte: Elaborado pela autora.

Pode-se observar na **Figura 35** que na concentração de 100 μ M (3) o análogo CcdBET-2 começa a inibir a ação da enzima topoisomerase II α , porém, de uma maneira muito tímida, haja vista a pequena intensidade da banda existente no estado superenovelado, comparado com o controle negativo (1). Além disso, esta é uma concentração bastante alta em relação às outras, sendo assim, pode-se considerar que o resultado é satisfatório, pois, nas demais concentrações o peptídeo não interferiu na ação da enzima humana. Para o peptídeo CcdBSG-2, não foi observado inibição da atividade desta enzima para nenhuma das concentrações testadas.

É importante ressaltar que nenhum estudo relacionado à inibição de topoisomerasas humanas ainda haviam sido realizadas pelo grupo de pesquisa. Estes resultados além de inéditos são bastante relevantes para demonstrar a especificidade dos peptídeos à topoisomerasas bacterianas, o que é fundamental para aplicação como antibióticos.

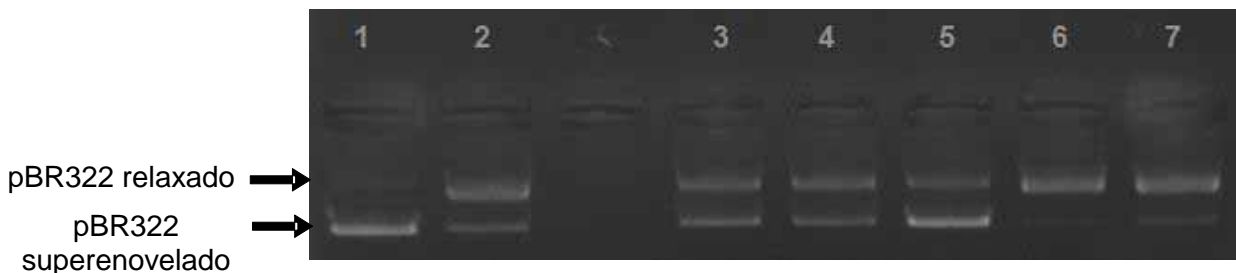
Além da topoisomerase II α humana, ensaios com enzima topoisomerase I humana também foi proposto com o intuito de analisar se os análogos sintetizados inibiam sua ação (**Figura 37** e **Figura 38**).

Figura 37 - Ensaio de inibição enzimática com o análogo CcdBET-2 em topoisomerase I humana. Em **1** tem-se o controle negativo, onde o plasmídeo encontra-se superenovelado sem ação da topoisomerase I; em **2** tem-se o controle positivo, onde o plasmídeo está sob ação da topoisomerase I; **3-7** tem-se o plasmídeo em contato com a enzima e CcdBET-2 nas concentrações 100 μM , 50 μM , 25 μM , 15 μM e 5 μM respectivamente.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 38 - Ensaio de inibição enzimática com o análogo CcdBSG-2 em topoisomerase I humana. Em **1** tem-se o controle negativo, onde o plasmídeo encontra-se superenovelado sem ação da topoisomerase I; em **2** tem-se o controle positivo, onde o plasmídeo está sob ação da topoisomerase I; **3-7** tem-se o plasmídeo em contato com a enzima e CcdBSG-2 nas concentrações 100 μM , 50 μM , 25 μM , 15 μM e 5 μM .



Fonte: Elaborado pela autora.

Podemos observar, quando comparamos os controles negativo e positivo, que ambos os peptídeos não apresentaram atividade de inibição da ação da topoisomerase I humana em nenhuma das concentrações testadas. Tanto na **Figura 37** quanto na **Figura 38**, é possível notar uma banda de pequena intensidade no estado superenovelado em todos os testes realizados. No entanto, comparando com o controle positivo (2), podemos concluir que a enzima estava apresentando uma atividade um tanto quanto abaixo do esperado, já que neste controle, a enzima deveria ter convertido totalmente o plasmídeo superenovelado ao estado relaxado, o que não aconteceu devido à presença de uma banda ainda no estado superenovelado. Mas, como os resultados dos testes são comparativos

aos controles, podemos concluir que os peptídeos não inibiram a ação desta enzima humana também, corroborando com a característica dos peptídeos estudados serem altamente específicos somente para topoisomerasas bacterianas e supostamente atóxicas a células humanas.

4.4.3. Ensaio de atividade hemolítica

Os testes de atividade hemolítica foram realizados de acordo com protocolo descrito no item 3.2.6, com o intuito de investigar a toxicidade dos peptídeos frente a células eucarióticas.

Nestes estudos foram utilizadas as concentrações de 100 µM, 25 µM e 6,25 µM para cada um dos peptídeos. Para o análogo CcdBSG-2 os resultados encontrados estão representados na **Tabela 6**.

Tabela 6 - Resultados do teste hemolítico para o análogo peptídico CcdBSG-2.

Amostra	Abs: 405 nm
Triton + Solução de Eritrócito (SE) (Controle positivo - 100% de hemólise)	1,643
PBS + Solução de Eritrócito (SE) (Controle negativo - 0% de hemólise)	0,05
SE + solução de CcdBSG-2 (100 µM)	0,234
SE + solução de CcdBSG-2 (25 µM)	0,193
SE + solução de CcdBSG-2 (6,25 µM)	0,162

Fonte: Elaborado pela autora.

Aplicando a equação: $\% \text{ de hemólise} = \frac{A_{\text{Amostra}} - A_{\text{PBS}}}{A_{\text{Triton}} - A_{\text{PBS}}} \times 100$, obtivemos o percentual de atividade hemolítica para este análogo nas diferentes concentrações testadas, cujos resultados estão representados na **Tabela 7**.

O mesmo tipo de ensaio foi realizado para o análogo CcdBET-2, cujos resultados são apresentados na **Tabela 8** e na **Tabela 9**.

Tabela 7 - Porcentagem de atividade hemolítica para diferentes concentrações de CcdBSG-2.

Concentração de CcdBSG-2	% Hemolítica
100 μ M	11,55
25 μ M	8,97
6,25 μ M	7,03

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 8 - Resultados do teste hemolítico para o análogo peptídico CcdBET-2.

Amostra	Abs: 405 nm
Triton + Solução de Eritrócito (SE) (Controle positivo - 100% de hemólise)	1,979
PBS + Solução de Eritrócito (SE) (Controle negativo - 0% de hemólise)	0,067
SE + solução de CcdBET-2 (100 μ M)	0,201
SE + solução de CcdBET-2 (25 μ M)	0,118
SE + solução de CcdBET-2 (6,25 μ M)	0,101

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 9 - Porcentagem de atividade hemolítica para diferentes concentrações de CcdBET-2.

Concentração de CcdBET-2	% Hemolítica
100 μ M	7,01
25 μ M	2,67
6,25 μ M	1,78

Fonte: Elaborado pela autora.

Como é possível observar, os valores de porcentagem de hemólise para ambos os análogos peptídicos foram menores que 12% a uma concentração de 100 μ M, a qual é utilizada para a confecção dos lipossomas. Este valor porcentual é considerado mínimo para um fármaco, estando dentro do valor de segurança. Desta maneira, não foi necessário a obtenção da concentração hemolítica 50 (HC₅₀), a qual deve ser bem superior a 100 μ M para ambos os peptídeos.

Estes resultados corroboram com a característica de ausência de atividade inibitória desses peptídeos com as enzimas topoisomerases humanas, dando a esses compostos uma característica de extrema importância para suas aplicações como agentes antimicrobianos agindo especificamente em células bacterianas, não possuindo ação citotóxica para células humanas.

4.5. Ensaios de Viabilidade Celular

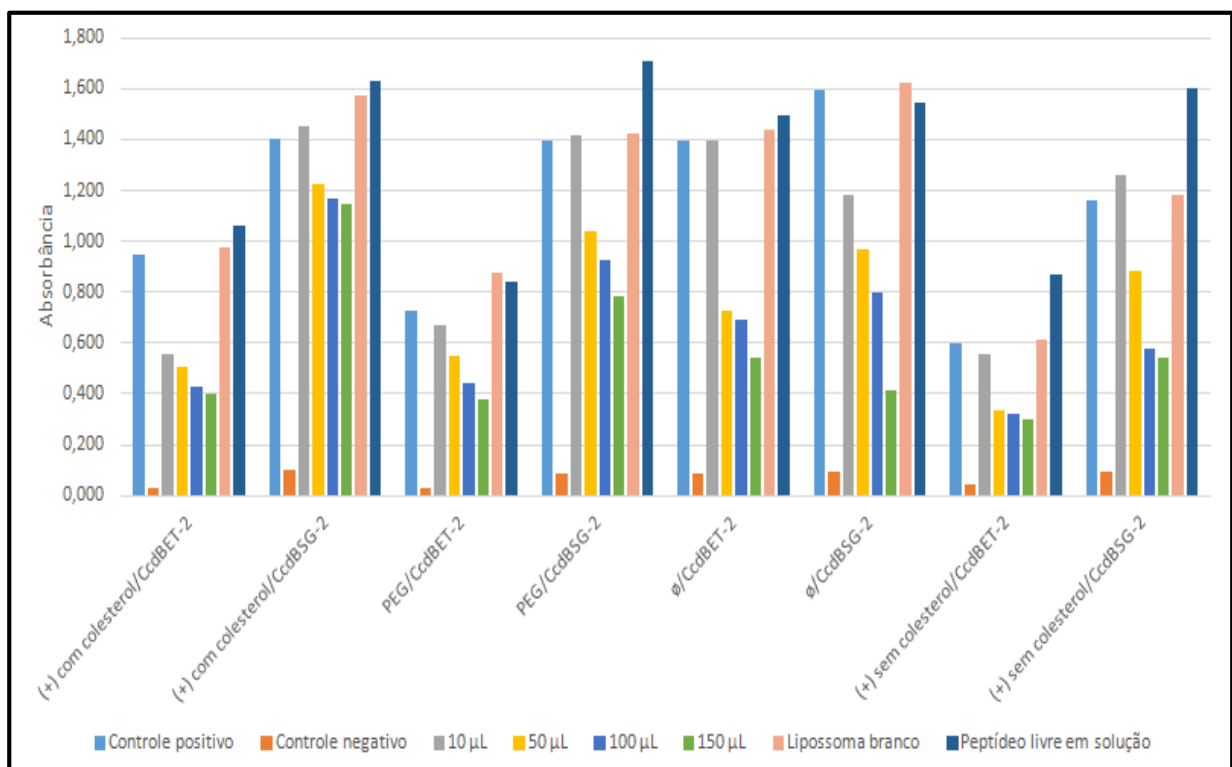
Os ensaios de viabilidade celular foram realizados como descrito na metodologia no item 3.2.7. A bactéria utilizada como representante das bactérias do grupo das Gram positivas foi *Staphylococcus aureus* e, como Gram negativa, foi utilizado a *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC). As quatro formulações propostas foram utilizadas para estes ensaios.

Os resultados mostram que contra *Escherichia coli* enterohemorrágica (**Figura 39**), o número de células indiretamente mortas não é tão elevado quando comparado à *Staphylococcus aureus* (**Figura 40**). Observa-se que há uma

quantidade significativa de células que não sobreviveram, principalmente para as formulações neutra e PEG quando utilizados quantidades de lipossomas correspondentes a 50 e 100 μL , indicando que essas formulações são relativamente mais eficientes para promover a fusão com a membrana bacteriana, permitindo a liberação dos peptídeos no meio citoplasmático.

De maneira geral também pode-se dizer que o análogo CcdBET-2 é mais eficaz em promover a morte de *Escherichia coli* enterohemorrágica comparado ao CcdBSG-2. Os melhores sistemas peptídeo-lipossoma para esta espécie bacteriana foram a formulação PEG encapsulada com CcdBET-2 e a formulação neutra encapsulada com CcdBET-2.

Figura 39 - Resultados obtidos utilizando *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), cada agrupamento de barras representa um teste realizado com uma formulação de lipossoma encapsulada a um análogo.

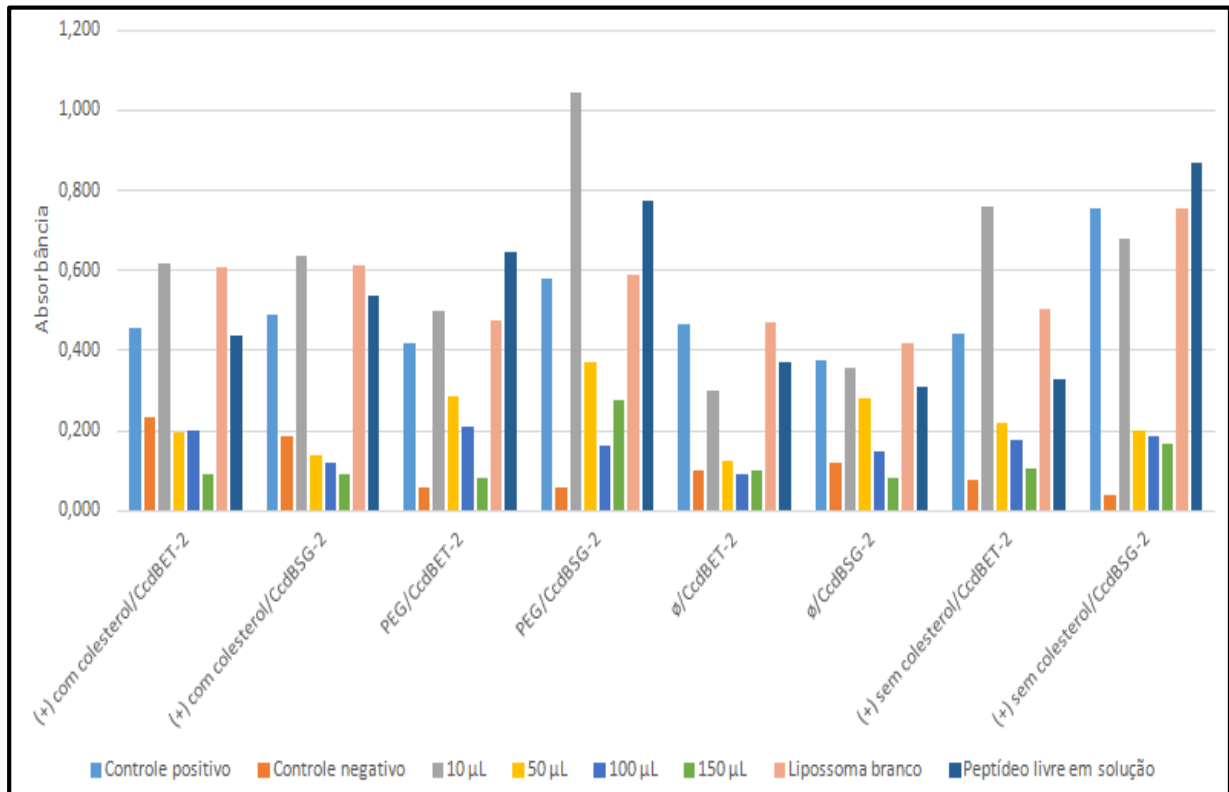


Fonte: Elaborado pela autora.

Nos resultados apresentados na **Figura 40**, relativos aos ensaios utilizando a bactéria *Staphylococcus aureus*, pode-se perceber que as melhores formulações que promoveram o controle de crescimento desta espécie bacteriana

foram as formulações neutra e positiva sem colesterol. Novamente o análogo mais eficaz para esta bactéria foi o CcdBET-2.

Figura 40 - Resultados dos testes utilizando *Staphylococcus aureus*, cada agrupamento de barras representa um teste realizado com uma formulação de lipossoma encapsulada a um análogo.



Fonte: Elaborado pela autora.

Em linhas gerais, houve inibição de crescimento relevante em todos os ensaios realizados, indicando que o sistema peptídeo-lipossoma é eficaz e efetivo para causar a morte dessas espécies bacterianas. Mais uma vez pode-se concluir que o sistema proposto como carreador de peptídeos para seu alvo celular é efetivo.

É importante destacar que nos resultados referentes a ambos os peptídeos livres em solução, isto é, não encapsulados em lipossoma, observou-se a incapacidade dos mesmos em inibir o crescimento das duas espécies bacterianas estudadas, quando comparamos com o controle positivo de crescimento. Novamente estes resultados demonstram que os sistemas lipossomais são essenciais para promover o carregamento dos peptídeos para o meio intracelular.

Os resultados referentes às **Figuras 39** e **40**, foram avaliados quantitativamente e as tabelas abaixo mostram as formulações que tiveram o menor número de células viáveis e, portanto, maior inibição no crescimento bacteriano (**Tabela 10** e na **Tabela 11**).

Tabela 10 - Porcentagem de inibição do crescimento bacteriano, utilizando *Staphylococcus aureus*.

<i>Staphylococcus aureus</i>		
	+ sem colesterol/ CcdBET-2	(Ø) neutra/ CcdBET-2
Volume	% de inibição	% de inibição
10	0	35,5
50	50,7	73,6
100	60,1	80,9
150	70,9	82,4

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 11 - Porcentagem de inibição do crescimento bacteriano, utilizando *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC).

<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC)		
	PEG/ CcdBET-2	(Ø) neutra/ CcdBET-2
Volume	% de inibição	% de inibição
10	6,9	0
50	24,3	48,0
100	38,4	50,3
150	48,1	61,2

Fonte: Elaborado pela autora.

Pode-se observar que para a bactéria gram positiva *Staphylococcus aureus*, houve uma inibição de 70,9% utilizando lipossoma com carga efetiva positiva sem adição de colesterol e uma inibição de 82,4% utilizando lipossoma neutra, ambos contendo CcdBET-2 encapsulado.

Para a bactéria gram negativa *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), observa-se que a inibição foi relativamente menor, possivelmente devido a maior complexidade estrutural da bactéria, pois, diferentemente da bactéria gram positiva, apresenta uma membrana externa que serve como barreira seletiva para a entrada e saída de alguns componentes, dificultando a fusão do sistema lipossomal. Porém, ainda assim, é possível observar que houve inibição do crescimento bacteriano.

Os resultados mostram uma inibição de 48,1% utilizando lipossoma contendo PEG (polietilenoglicol) e uma inibição de 61,2% utilizando lipossoma neutra, ambas contendo também o análogo CcdBET-2 encapsulado.

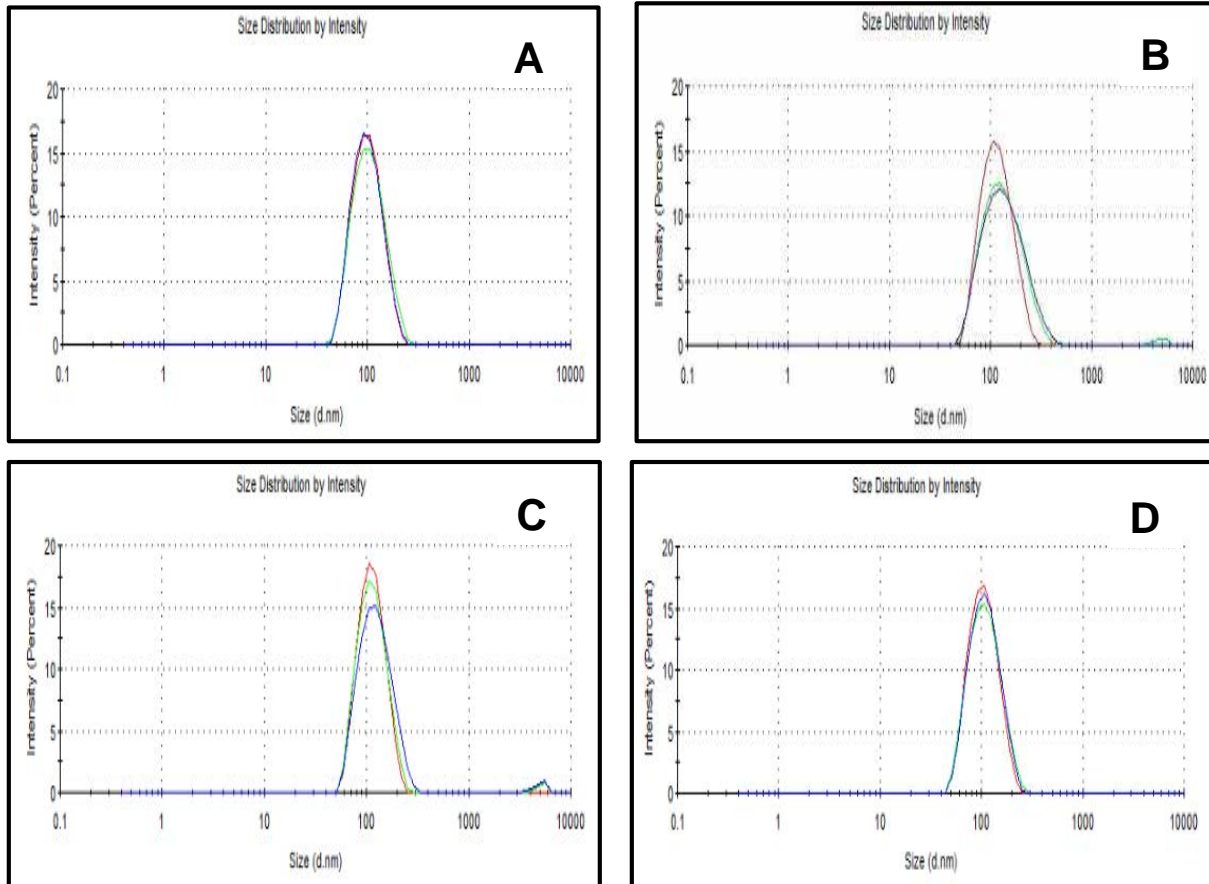
É importante destacar que os resultados aqui apresentados são inéditos no que se refere aos estudos de atividade microbiológica dos análogos peptídicos de CcdB, desenvolvidos pelo grupo de pesquisa. Certamente esses estudos irão permitir um grande avanço em outros estudos que estão sendo realizados, o que trará maior impacto nas futuras publicações.

4.6. Caracterização Física dos lipossomas

Para cada formulação, foi feito um estudo de caracterização, utilizando lipossoma branco e lipossoma com peptídeo encapsulado, com o intuito de avaliar se o diâmetro da vesícula lipossomal sofreria alteração após a encapsulação dos peptídeos.

Os estudos de caracterização das diferentes formulações de lipossomas desenvolvidas neste trabalho foram realizados pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (light scattering), conforme metodologia descrita no item 3.2.5. Na **Figura 41** estão representados os espectros de distribuição do tamanho médio das partículas das diferentes formulações lipossomais sem conter peptídeo encapsulado.

Figura 41 - Ensaio de caracterização de lipossomas na ausência de peptídeo. (A) formulação Neutra apresentou tamanho médio de 104,3 nm; (B) formulação PEG apresentou tamanho médio de 120,6 nm; (C) formulação positiva (+) apresentou tamanho médio de 115,6 nm; (D) formulação positiva sem colesterol apresentou tamanho médio de 108,3 nm.

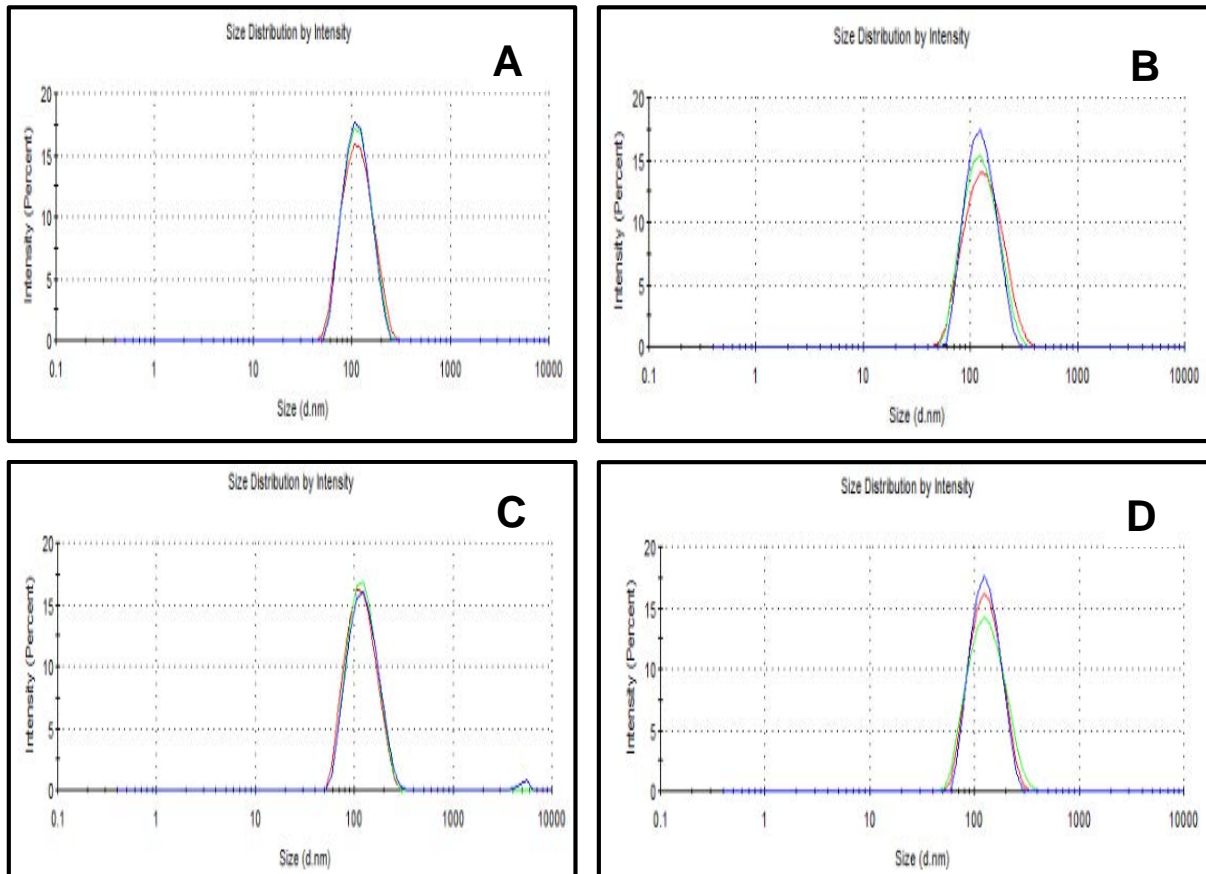


Fonte: Elaborado pela autora.

Para a realização dos estudos de caracterização dos lipossomas contendo peptídeo encapsulado, utilizamos o análogo CcdBSG-2, o qual estava disponível em maior quantidade nesta etapa do projeto. O processo de encapsulação do peptídeo provocou um aumento de cerca de 10-20% no tamanho médio das vesículas lipossomais, conforme pode ser observado nos espectros de distribuição do tamanho médio das partículas das diferentes formulações contendo peptídeo encapsulado (**Figura 42**).

Como exemplo, comparando o espectro B da **Figura 41** com o espectro B da **Figura 42**, os quais correspondem à formulação de lipossoma contendo PEG, o tamanho médio das vesículas salta de 120,6 nm para 141,5 nm, um aumento de 17%, quando o peptídeo está presente na formulação.

Figura 42 - Ensaio de caracterização de lipossomas contendo o peptídeo CcdBSG-2 encapsulado. (A) formulação Neutra apresentou tamanho médio de 120,1 nm; (B) formulação PEG apresentou tamanho médio de 141,5 nm; (C) formulação positiva (+) apresentou tamanho médio de 122,5 nm; (D) formulação positiva sem colesterol apresentou tamanho médio de 134,0 nm.



Fonte: Elaborado pela autora.

De acordo com os resultados, é possível observar um aumento médio de 20% no tamanho dos lipossomas produzidos, sugerindo que o peptídeo realmente foi compartimentalizado durante o processo de extrusão. Acredita-se ainda que a velocidade no processo de extrusão e o número de ciclos de extrusão são fatores que podem influenciar no tamanho final da partícula. Nesse sentido, nosso protocolo de preparo dos lipossomas utiliza 40 ciclos de extrusão de maneira lenta e contínua.

Além disso, pela análise dos resultados obtidos nos ensaios de viabilidade celular, nos permite concluir que aumento no tamanho dos lipossomas provocados pela encapsulação do peptídeo, não interfere na função de promover o carregamento dos peptídeos para o meio intracelular, para que os mesmos

desempenhem seu papel biológico de inibir as enzimas topoisomerasas bacterianas.

5. Conclusões

- A síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) mostrou-se uma técnica eficaz para a produção dos análogos estruturais do CcdB. Os processos de síntese, purificação e caracterização ocorreram sem maiores problemas, independentemente do tamanho e da complexidade das sequências de aminoácidos.
- Os ensaios *in vitro* de superenovelamento e relaxamento do DNA (plasmídeo pBr 322), por eletroforese em gel de agarose, indicaram que o análogo peptídico sintético CcdBET-2 atua como inibidor das atividades da DNA girase e topoisomerase IV a uma concentração mínima inibitória de 25 μM para ambas as enzimas, inferiores àqueles obtidos para a molécula de CcdB natural (100 $\mu\text{g/mL}$).
- O análogo CcdBSG-2 atua como inibidor das atividades da DNA girase e topoisomerase IV a uma concentração mínima inibitória de 15 μM para ambas as enzimas, resultado ainda inferior comparado ao análogo CcdBET-2.
- Os estudos de eficiência de encapsulação dos análogos CcdBET-2 e CcdBSG-2 utilizando a formulação de lipossoma que contém agente de carga positiva sem colesterol, foi aproximadamente de 68% e 62% respectivamente.
- Para a formulação de lipossoma que contém PEG (Polietilenoglicol), observou-se que a eficiência de encapsulação para o análogo CcdBET-2 é de 71% e para o CcdBSG-2 é de 65%. Acreditamos que a presença de PEG auxiliará em uma melhor associação dos lipossomas à membrana celular em estudos *in vivo*, por conferir ao lipossoma uma maior estabilidade ao sistema.

-
- Para o lipossoma com carga residual positiva, a porcentagem de eficiência foi de 75% para CcdBSG-2 e 52% para CcdBET-2. O fato de CcdBET-2 possuir carga residual positiva pode estar relacionado a maior dificuldade de interação do peptídeo com a micela lipossomal devido ao efeito repulsivo de cargas. Este dado é bastante importante, haja vista que o grupo de pesquisa desenvolve peptídeos antimicrobianos de diferentes características o que torna esta informação importante em projetos paralelos que estão sendo desenvolvidos.
 - Para Lipossomas de caráter neutro (\emptyset), a eficiência de encapsulação para os análogos CcdBET-2 e CcdBSG-2 foi de 70% e 75% respectivamente.
 - Os testes realizados com as topoisomerasas humanas revelaram que ambos os análogos peptídicos CcdBET-2 e CcdBSG-2 não são capazes de inibir a atividade das enzimas até a concentração de 100 μ M. Estes testes são importantes indícios que os peptídeos não provocam efeito citotóxico em células humanas, uma característica fundamental para a aplicação destes compostos como fármacos.
 - Os testes de capacidade hemolítica demonstraram que os peptídeos CcdBET-2 e CcdBSG-2 apresentam capacidade hemolítica abaixo de 12% em concentração 100 μ M, valor este que os caracterizam como não tóxicos aos eritrócitos humanos.
 - O sistema peptídeo-lipossoma é eficaz contra as espécies bacterianas *Staphylococcus aureus* e EHEC – *Escherichia coli heterohemorrágica*. Todas as formulações testadas com ambos os peptídeos encapsulados mostraram uma diminuição da quantidade de células inicial, dando indícios de que o sistema é eficiente.

-
- Para a inibição do crescimento de bactérias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*) as melhores formulações foram a neutra e a positiva sem colesterol com o análogo CcdBET-2 encapsulado.
 - Para a inibição do crescimento bacteriano de Gram negativas (*Escherichia coli* enterohemorrágica - EHEC), as formulações que mostraram melhores resultados foram a contendo polietilenoglicol (PEG) e a neutra, também com o análogo CcdBET-2 encapsulado.
 - Os ensaios com lipossoma branco, de todas as formulações, mostraram que não são capazes de inibir o crescimento bacteriano, indicando que de fato, o que provoca a inibição são os peptídeos antimicrobianos CcdBET-2 e CcdBSG-2.
 - Este mesmo comportamento foi observado nos ensaios realizados com os peptídeos livres em solução, mostrando que sem estarem associados aos lipossomas, os peptídeos não possuem capacidade de inibir o crescimento bacteriano.
 - Os ensaios de caracterização de lipossomas, indica que as vesículas sofrem um aumento do tamanho do diâmetro médio na ordem de 20% após a encapsulação do peptídeo, porém isso não interfere nos ensaios de inibição de crescimento bacteriano, que mostrou a eficiência dos sistemas lipossoma-peptídeo.

REFERÊNCIAS

ALI, J. A.; JACKSON, A. P.; HOWELLS, A. J. ; MAXWELL, A. The 43 - Kilodalton N- Terminal fragmente of DNA gyrase B protein hydrolyzes ATP and binds coumarins drugs. **Biochemistry**, v. 32, n. 10, p. 2717-2724, 1993.

AMBLARD, M.; FEHRENTZ, J. A.; MARTINEZ, J.; SUBRA, G. Fundamentals of modern peptide synthesis. **Methods in Molecular Biology**, v. 228, p. 3-24, 2005.

BANGHAM, A. D. Lipid bilayers and biomembranes. **Annual Review Biochemistry**, v. 41, p. 753-776, 1972.

BARBOSA, L. C. B.; CANGUSSU, A. S. R.; GARRIDO, S. S.; MARCHETTO, R. Toxin-antitoxin systems and its biotechnological applications. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 11-17, 2014.

BERGER, J. M.; GAMBLIN, S. J.; HARRISON, S. O.; WANG, J. C. Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. **Nature**, v. 379, p. 225-232, 1996.

BERNARD, P.; COUTURIER, M. Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. **Journal of Molecular Biology**, v. 226, n. 3, p. 735-745, 1992.

BURDEN, D. A.; OSHEROFF, N. Mechanism os action of eukaryotic topoisomerase II and drug targets to the enzyme. **Biochimica et Biophysica Acta: Gene Structure and Expression**, v. 1400, p. 139-154, 1998.

CARMICHAEL, J.; DEGRAFF, W. G.; GAZDAR, A. F.; MINNA, J. D.; MITCHELL, J. B. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. **Cancer Research**, v. 47, p. 936-942, 1987.

CHAMPOUX, J. J. Mechanistic aspects of type-II DNA topoisomerase. In: WANG, J.C.; COZARELLI, N. R. **DNA topology and its biological effects**. Huntington: Cold Spring Harbor Laboratory Press,1990. Chap. 6, p. 217-242.

CHANG, T. M. S. Semipermeable microcapsules. **Science**, v. 146, p. 524-525, 1964.

CHEN, A. Y.; LIU, L. F. DNA topoisomerases: essential enzymes and lethal targets. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 34, p. 191-218, 1994.

CHORILLI, M.; LEONARDI, G. R.; OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V. Lipossomas em formulações dormocosméticas. **Infarma**, v. 16, n. 7/8, p. 75-79, 2004.

CHORILLI, M.; RIMÁRIO, T. C.; OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M.V. Obtenção e caracterização de lipossomas unilamelares pequenos contendo cafeína. **Latin American Journal Pharmacy**, v. 26, n. 5, p. 715-722, 2007.

CLINICAL LABORATORY STANDARD INSTITUTE. **M07-A9**: methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Wayne, 2012. 17 p.

COUTURIER, M.; BAHASSI, M.; VAN MELDEREN, L. Bacterial death by DNA gyrase poisoning. **Trends in Microbiology**, v. 6, p. 269-275, 1998.

CRITCHLOW, S. E.; O'DEA, M. H.; HOWELLS, A. J.; COUTURIER, M.; GELLERT, M.; MAXWELL, A. The interaction of the F-plasmid killer protein CcdB with DNA gyrase: induction of DNA cleavage and blocking of transcription. **Journal of Molecular Biology**, v. 273, p. 826-839, 1997.

DRULIS-KAWA, Z.; DOROTKIEWICZ-JACH, A. Liposomes as delivery systems for antibiotics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 387, n. 112, p. 187-198, 2010.

FORTUNE, J. M.; OSHEROFF, N. Merbarone inhibits the catalytic activity of human topoisomerase II α by blocking DNA cleavage. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 28, p. 17643-17650, 1998.

GABRIELSON, J.; HART, M.; JARELOV, A.; KUHN, I.; MCKENZIE, D.; MOLLBY, R. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 50, p. 63-73, 2002.

GARCIA, A. **Peptídeos derivados da proteína bacteriana YacG**: síntese e estudos de estrutura-função. 2010. 85 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

GARRIDO, S. S. **Novos inibidores peptídicos de topoisomerasas bacterianas estruturalmente derivados da proteína CcdB**. 2007. 115 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

GERDES, K.; AYORA, S.; CANOSA, I.; CEGLOWSKI, P.; DÍAZ-OREJAS, R.; FRANCH, T. Plasmid maintenance system. In: THOMAS, C. M. (Ed). **The horizontal gene pool**. Amsterdam: Harwood Academic, 2000. p. 52-91.

GREGORIADIS, G.; LEATHWOOD, P. D.; RYMAN, B. E. Enzyme entrapment in liposomes. **FEBS Letters**, v. 14, p. 95-99, 1971.

HASHIMI, S. M.; WALL, M. K.; SMITH, A. B.; MAXWELL, A.; BIRCH, R. G. The phytotoxin albicidin is a novel inhibitor of DNA gyrase. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 51, p. 181-187, 2007.

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

- HOLDEN, J. A. DNA topoisomerases as anticancer drug targets from the laboratory to the clinic. **Current Medicinal Chemistry: Anti-Cancer Agents**, v. 1, n. 1, p. 1-25, 2001.
- JAFFE, A.; OGURA, T.; HIGARA, S. Effects of the ccd function of the F plasmid on bacterial growth. **Journal of Bacteriology**, v. 163, p. 841-849, 1985.
- KADRY, A. A.; AL-SUWAYEH, S. A.; ABD-ALLAH, A. R. A.; BAYOMI, M. A. Treatment of experimental osteomyelitis by liposomal antibiotics. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. 54, p. 1103-1108, 2004.
- KAISER, E.; COLESCOT, T. L.; BOSSINGE, C. D.; COOK, P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in solid-phase synthesis of peptides. **Analytical Biochemistry**, v. 34, n. 2, p. 595-598, 1970.
- 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.
- KELLNER, U; RUDOLPH, P; PARWARESCH, R. Human DNA topoisomerase diagnostic and therapeutic implications for cancer. **Onkologie**, v. 23, p. 424-430, 2000.
- KHODURSKY, A. B.; PETER, B. J.; SCHMID, M. B.; DeRISI, J.; BOTSTEIN, D.; BROWN, P. O.; COZZARELLI, N.R. Analysis of topoisomerase function in bacterial replication fork movement: use of DNA microarrays. **Proceedings of National Academy of Science United of State America**, v. 97, p. 9419-9424, 2000.
- KO, L.; MAITLAND, A.; FEDAK, P. W.; DUMONT, A. S.; BADIWALA, M.; LOVREN, F.; TRIGGLE, C. R.; ANDERSON, T. J.; RAO, V.; VERMA, S. Endothelin blockade potentiates endothelial protective effects of ACE inhibitors in saphenous veins. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 73, n. 4, p. 1185-1188, 2002.
- KORNBERG, A.; BAKER, T. A. DNA structure and function. **DNA replication**. New York: *WH Freeman*, 1992. Chap. 1, p. 1-53.
- 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.
- LICHTENBERG, D.; BARENHOLZ, Y. Liposomes: preparation, characterization, and preservation. **Methods of Biochemical Analysis**, v. 33, p. 337-462, 1988.

- LINS, A. C. S. **Estudo químico e atividade antioxidante de *Bauhinia pentandra* (Bong.) Vog. Ex Steud e avaliação da atividade inibitória da enzima topoisomerase II- α humana de substâncias naturais e semi-sintéticas**. 2008. 130 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Laboratório de Tecnologia Farmacêutica prof. Delby Fernandes de Medeiros, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.
- LLOYD-WILLIAMS, P.; ALBERICIO, F.; GIRALT, E. **Chemical approaches to the syntesis of peptides proteins**. Boca Raton: CRC, 1997.
- 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, 2001. p. 149-165.
- LOPES, L. B.; OLIVEIRA, A. G. Lipossomas de longa circulação: estrutura e aplicações. **Infarma**, v. 12, p. 66-70, 2000.
- LORENZÓN, E. N. **Efeito do comprimento e da polaridade do espaçador entre cadeias do peptide Hylina-C na forma dimérica**. 2011. 69 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.
- LORIS, R.; DAO-THI, M. H.; BAHASSI, E. M.; VAN MELDEREN, L.; POORTMANS, F.; LIDDINGTON, R.; COUTURIER, M.; WYNS, L. Crystal structure of CcdB, a topoisomerase poison from E-coli. **Journal of Molecular Biology**, v. 285, p. 1667-1677, 1999.
- MARCHETTO, R. **A química de peptídeos e o mecanismo de inibição da atividade da DNA girase**. 2006. 95 f. Tese (Livre-Docência) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.
- MATOS, M. J. **[Espectros de absorção da hemoglobina]**. 2003. Disponível em : <<http://www1.ci.uc.pt/pessoal/manolo/Hboxydes.pdf>>. Acesso em: 17 jun. 2014.
- MAXWELL, A. The molecular basis of quinolone action. **Jounal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 30, n. 4, p. 409-414, 1992.
- MAXWELL, A. The interaction between coumarin drugs and DNA gyrase. **Molecular Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 681-686, 1993.
- MAXWELL, A. DNA gyrase as a drug target. **Trends In Microbiology**, v. 5, p. 102-109, 1997.
- MIKI, T.; YOSHOIKA, K.; HORIUCHI, T. Control of cell division by sex factor F in *Escherichia coli*. I. The 42.84-43.6 F segment couples cell division of the host bacteria with replication of plasmid DNA. **Jounal of Molecular Biology**, v. 174, p. 605-625, 1984.

- MORGAN, D. M. Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity. **Methods in Molecular Biology**, v. 79, p. 179-183, 1998.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- NEW, R. R. C. **Liposomes**: a practical approach. Oxford: Oxford University Press, 1990. p. 320.
- OGURA, T.; HIRAGA, S. Mini F plasmid gene that couple host cell division to plasmid proliferation. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v. 80, p. 4784-4788, 1983.
- OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; LEITE, C. Q. F. Lipossomas: estratégia biotecnológica para liberação controlada e direcionamento de fármacos com efeito antimicobacteriano. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada** v. 18, p. 109-121, 1997.
- PENG, H.; MARIANS, K. J. *Escherichia coli* topoisomerase IV. Purification, characterization, subunit structure, and subunit interactions. **Journal Biological Chemistry**, v. 268, n. 32, p. 24481-24490, 1993.
- POMMIER, I. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, p. 789-806, 2006.
- RAMANH, M.; KÜHN, I.; RAHMAN, M.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; MÖLLBY, R. Evaluation of a scanner-assisted colorimetric MIC method for susceptibility testing of gram-negative fermentative bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v. 70, p. 2398-2403, 2004.
- REECE, R.; MAXWELL, A. DNA gyrase: structure and function. **Critical Reviews In Biochemistry and Molecular Biology**, v. 26, p. 335-375, 1991.
- ROCA, J.; WANG, J. C. The capture of a DNA double helix by an ATP-dependent protein clamp: a key step in DNA transport by topo I DNA topoisomerases. **Cell**, v. 71, p. 833-840, 1992.
- SANTOS, N. C.; CASTANHO, M. A. R. B. Lipossomas: a bala mágica acertou? **Química Nova**, v. 25, n. 6B, p. 1181-1185, 2002.
- SIGMA-ALDRICH. **5 (6)-carboxyfluorescein**: bioreagent, suitable for fluorescence, ≥95% (HPLC). 2014. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/21877?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 17 jun. 2014.
- SMITH, C. V.; MAXWELL, A. Identification of a residue involved in transition-state stabilization in the ATPase reaction of DNA gyrase. **Biochemistry**, v. 37, p. 9658-9667, 1998.

SMITH, A. B.; MAXWELL, A. A strand-passage conformation of DNA gyrase is required to allow the bacterial toxin, CcdB, to access its binding site. **Nucleic Acids Research**, v. 34, p. 4667-4676, 2006.

STECK, T. R.; DRLICA, K. Bacterial chromosome segregation: evidence for DNA gyrase involvement in decatenation. **Cell**, v. 36, p. 1081-1088, 1984.

STENTELAIRE, C.; ANTOINE, N.; CABROL, C.; FERON, G.; DURAND, A. Development of a rapid and highly sensitive biochemical method for the measurement of fungal spore viability. An alternative to the CFU method. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, p. 560-566, 2001.

STEWART, J. M.; YOUNG, J. D. **Solid phase peptide synthesis**. 2nd ed. Rockford: Pierce Chemical Company, 1984.

STEWART, L.; REDINBO, M. R.; QUIXHOL, W. G. J.; CHAMPOUX, J. J. A model for the mechanism human topoisomerase I. **Science**, v. 279, p. 1534-1541, 1998.

TROVATTI, E. **Síntese e estudos de inibição da atividade da DNA girase por análogos peptídicos da toxina bacteriana CcdB**. 2006. 109 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

TROVATTI, E.; COTRIM, C.; GARRIDO, S. S.; BARROS, R. S.; MARCHETTO, R. Peptides based on CcdB protein as novel inhibitors of bacterial topoisomerases. **Biorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 23, p. 6161-6164, 2008.

TUNNEY, M. M.; RAMAGE, G.; FIELD, T. R.; MORIARTY, T. F.; STOREY, D. G. Rapid colorimetric assay for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 48, p. 1879-1881, 2004.

VALKOV, N. I.; SULLIVAN, D. M. Tumor p53 status and response to topoisomerase II inhibitors. **Drug Resistance Updates**, v. 6, p. 27-39, 2003.

VEMURIS, S.; RHODES, C. T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 70, p. 95-111, 1995.

WANG, J. C. Interaction between DNA and an *Escherichia coli* protein omega. **Journal of Molecular Biology**, v. 55, p. 523-533, 1971.

WANG, J. C. DNA Topoisomerases as targets of therapeutics: an overview. **Advances in Pharmacology**, v. 29A, p. 1-19, 1994.

WANG, J. C. DNA topoisomerases. **Annual Review Biochemistry**, v. 65, p. 635-692, 1996.

WANG, J. C. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. **Nature**, v. 3, p. 430-440, 2002.

WANG, H.; CHENG, H.; WANG, F.; WEI, D.; WANG, X. An improved 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) reduction assay for evaluating the viability of *Escherichia coli* cells. **Journal of Microbiological Methods**, v. 82, p. 330-333, 2010.

WEBB, M. S.; BOMAN, N. L.; WISEMAN, D. J.; SAXON, D.; SUTTON, K.; WONG, K. F.; LOGAN, P.; J. HOPE, M. J. Antibacterial efficacy against an in Vivo *Salmonella typhimurium*. Infection model and pharmacokinetics of a Liposomal. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 1, p. 45-52, 1998.

WIGLEY, D. B. Structure and mechanism of DNA gyrase. In: BUJNICKI, J. M. (Ed.). **Nucleic Acids and Molecular Biology**. New York: Springer-Verlag, 1995.