

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE FARMÁCIA E BIOQUÍMICA DE ARARAQUARA

UNESP

**ESTUDOS DE PERMEÇÃO E LIBERAÇÃO DE PEPTÍDEOS
ANTIMICROBIANOS ESTRUTURALMENTE DERIVADOS DA TOXINA CCDB**

Carolina Reis Zambom

Araraquara

2014

CAROLINA REIS ZAMBOM

"Estudos de permeação e liberação de peptídeos antimicrobianos estruturalmente derivados da toxina CcdB"

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Saulo Santesso Garrido

Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química

Instituto de Química – UNESP/Araraquara

Araraquara

2014

Agradecimentos

A Deus, por guiar meus passos, traçar meus caminhos e me levar a adiante mesmo quando não podia mais caminhar. Sendo minha força e segurança constantemente.

Aos meus pais, José Roberto e Eliane. Os responsáveis e donos de todas as minhas conquistas. Por estarem presentes sempre. Por serem as bases sólidas da minha vida e meus exemplos de integridade, força e amor.

A meu irmão, Betinho. O responsável pelos meus sorrisos e gargalhadas a cada final de semana em casa. Por ser minha inspiração e meu companheiro. Estando sempre perto de mim, mesmo longe.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Saulo Santesso Garrido. Pelos ensinamentos e conselhos. Por me mostrar um pouco da vida acadêmica e científica e participar grandemente de minha formação. E a Isabelle, companheira de ensaios, análises, projetos e uma grande amiga.

As farmacêuticas, Sabrina, Talita, Keila, Elizabeth, Cristina e Flaviane. Por me mostrarem o amor por essa profissão e compartilharem comigo o dia a dia da rotina de trabalho. Fazendo parte de minha vida profissional e pessoal.

Aos amigos de Araraquara. Aos dias quentes de Araraquara e a enorme saudade que me deixa essa cidade.

Ao Bruno, por me ensinar a seguir meu coração. Por ser o incentivo certo nos momentos oportunos e ser a melhor companhia, sempre.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 DNA topoisomerases bacterianas: DNA girase e topoisomerase IV	13
1.2 Sequências peptídicas com potencial antimicrobiano	14
1.3 Sistemas de liberação controlada de fármacos	17
1.4 Testes de inibição de crescimento bacteriano	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Síntese, purificação e caracterização dos análogos peptídicos de CcdB.....	21
3.2 Síntese de lipossomas do tipo SUV por extrusão e avaliação da encapsulação de moléculas peptídicas.....	22
3.3 Ensaio hemolítico envolvendo os análogos peptídicos CcdBET-2 e CcdBSG-2	24
3.3.1 Preparo da solução de eritrócitos.....	25
3.3.2 Preparo e realização do ensaio hemolítico com os peptídeos a serem avaliados ...	25
3.3.3 Análise dos resultados e cálculo da porcentagem de hemólise	26
3.4 Ensaio de inibição de crescimento bacteriano em meio líquido utilizando peptídeos encapsulados em lipossomas.....	27
4.1 Síntese de lipossomas do tipo SUV por extrusão e avaliação da encapsulação de moléculas peptídicas.....	29
4.2 Ensaio hemolítico envolvendo os análogos peptídicos CcdBET-2 e CcdBSG-2	36
4.3 Ensaio de inibição de crescimento bacteriano em meio líquido utilizando peptídeos encapsulados em lipossomas.....	40
5. CONCLUSÃO	47
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
7. DADOS FINAIS	51

RESUMO

O uso de peptídeos sintéticos para o desenvolvimento de novas drogas é uma estratégia promissora no campo da biotecnologia. Peptídeos derivados de toxinas bacterianas intracelulares, produzidas por sistemas de morte pós-segregacional (PKS) tais como CcdB e ParE são exemplos dessa estratégia. Porém, moléculas com estrutura peptídica derivadas de toxinas bacterianas apresentam sérios problemas na aplicação terapêutica por apresentarem baixa solubilidade e difícil permeabilidade em membranas bacterianas. O objetivo desse estudo consistiu no desenvolvimento e aprimoramento de sistemas nanoestruturados (lipossomas) que permita a imobilização de análogos peptídicos da toxina CcdB e sua consequente translocação no citosol bacteriano, permitindo que os mesmos atinjam seus alvos celulares, enzimas DNA girase e Topoisomerase IV. Lipossomas do tipo SUV ("small unilamellar vesicles"), foram preparados pela técnica de extrusão-evaporação variando-se suas formulações. Desta forma, pretendeu-se avaliar 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 encapsulados, foram submetidos a ensaio de inibição de crescimento em meio líquido para duas espécies bacterianas: *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Resultados demonstraram que a utilização de sistemas nanoestruturados 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 promissores, se associados a sistemas de transporte e liberação controlada de moléculas peptídicas.

PALAVRAS-CHAVE: Lipossomas, peptídeos antimicrobianos, toxinas bacterianas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da morte celular induzida por plasmídeo do sistema PSK. Temos em vermelho a toxina, em azul a antitoxina e em verde uma protease.	12
Figura 2. Estrutura primária da proteína natural CcdB de <i>Escherichia coli</i>	14
Figura 3. Estrutura primária dos análogos de CcdB utilizados neste trabalho.	15
Figura 4. Representação esquemática da estrutura proteica do CcdB (A). Estrutura primária do peptídeo sintético CcdBET2 (Z = ϵ -amino hexanóico) (B).	15
Figura 5. Fórmula para cálculo de porcentagem de hemólise.	26
Figura 6. Comparação entre as curvas de fluorescência de diversas amostras, após cromatografia. Curva de fluorescência mostrando o máximo de fluorescência para uma solução de concentração 100 μ M de CcdBET-2 (azul); o máximo em fluorescência para uma das amostras coletadas da coluna de cromatografia contendo somente peptídeo livre (vermelho); curva correspondente a uma fração contendo lipossomas com peptídeo encapsulado (verde).	30
Figura 7. Gráfico da curva padrão da concentração molar de CcdBET-2 por máximo de fluorescência.	31
Figura 8. Gráfico da curva padrão da concentração molar de CcdBSG-2 por máximo de fluorescência.	32
Figura 9. Exemplos de gráficos obtidos após a leitura das frações contendo CcdBET-2. Temos em (A) formulação positiva sem colesterol com máximo de fluorescência de 16,988; (B) Formulação positiva com colesterol com máximo de 47,040; (C) formulação contendo PEG com máximo de 27,875 e (D) formulação neutra com máximo de 28,557.	33
Figura 10. Exemplos de gráficos obtidos após a leitura das frações contendo o análogo CcdBSG-2. Temos em (A) Formulação positiva sem colesterol com máximo de fluorescência de 27,236; (B) Formulação positiva com colesterol com máximo de 12,282; (C) Formulação contendo PEG com máximo de 23,579; (D) Formulação neutra com máximo de 12,636.	34
Figura 11. Microplaca contendo as amostras referentes ao teste hemolítico para CcdBSG-2. Temos: poços (A1) Triton mais solução de eritrócitos; (A2) PBS mais solução de eritrócitos; (A4) (A5) (A6) (A7) sequência das concentrações de peptídeos 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 12,5 μ M juntamente com solução de eritrócitos.	37

Figura 12. Amostras contendo peptídeo CcdBET-2. Temos da esquerda para a direita; Triton mais solução de eritrócitos; PBS mais solução de eritrócitos; sequência das concentrações de peptídeos 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 12,5 μ M juntamente com solução de eritrócitos. Na linha de baixo o teste realizado em duplicata.38

Figura 13. Resultados dos testes utilizando *Staphylococcus aureus*, cada agrupamento de barras representa um teste realizado com uma formulação de lipossoma encapsulada a um análogo.43

Figura 14. Resultados obtidos utilizando *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), cada agrupamento de barras representa um teste realizado com uma formulação de lipossoma encapsulada a um análogo.45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composições lipídicas propostas para os lipossomas sintetizados.	24
Tabela 2. Comparação dos resultados de eficiência de encapsulação obtidos para os peptídeos análogos deste projeto.	35
Tabela 3. Resultados para CcdbSG-2 dos testes de hemólise.	38
Tabela 4. Resultados obtidos para porcentagem de hemólise de CcdBET-2.	39
Tabela 5. Resultados das absorbâncias (550nm) obtidas nos ensaios de inibição de crescimento bacteriano para <i>Staphylococcus aureus</i> utilizando CcdBET-2.	40
Tabela 6. Resultados das absorbâncias (550nm) obtidas nos ensaios de inibição de crescimento bacteriano para <i>Staphylococcus aureus</i> utilizando CcdBSG-2.	41
Tabela 7. Resultados das absorbâncias (550nm) obtidas nos ensaios de inibição de crescimento bacteriano para <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica utilizando CcdBSG-2.....	41
Tabela 8. Resultados das absorbâncias (550nm) obtidas nos ensaios de inibição de crescimento bacteriano para <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica utilizando CcdBET-2.....	41
Tabela 9. Porcentagem de inibição de crescimento bacteriano para <i>Staphylococcus aureus</i> utilizando o análogo CcdBET-2.	43
Tabela 10. Porcentagem de inibição de crescimento bacteriano para <i>Staphylococcus aureus</i> utilizando o análogo CcdBSG-2.	44
Tabela 11. Porcentagem de inibição de crescimento bacteriano para <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica utilizando o análogo CcdBET-2.	45
Tabela 12. Porcentagem de inibição de crescimento bacteriano para <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica utilizando o análogo CcdBSG-2.	46

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-Fluorenilmetiloxycarbonila

HOBt – N-Hidroxibenzotriazol

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 – Triisopropilsilano

UV-vis – Espectroscopia na região do Ultravioleta-visível

1. INTRODUÇÃO

No decorrer da última década, o desenvolvimento de fármacos para o combate de infecções bacterianas revolucionou o tratamento médico, resultando em drástica redução na mortalidade causada por doenças microbianas, uma das maiores causas de morte da população humana. O fenômeno de resistência bacteriana a diversos antibióticos impõe sérias limitações para o tratamento de infecções bacterianas, representando uma ameaça à saúde pública (SILVEIRA et al., 2006).

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 às doenças infecciosas (TROVATTI, 2006).

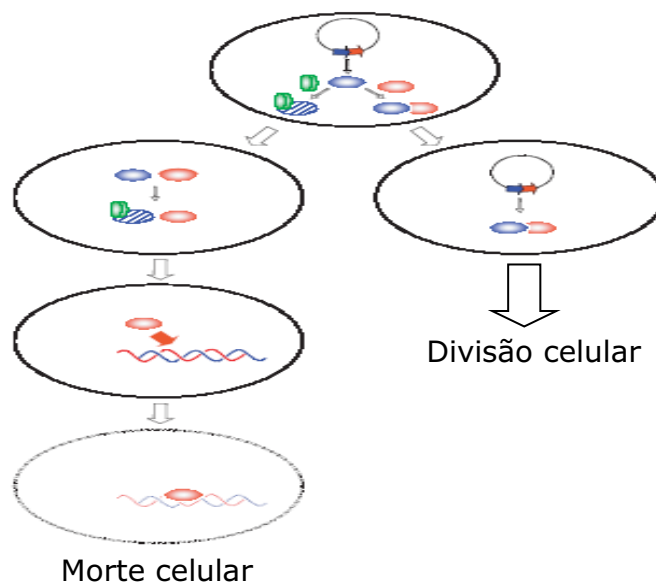
Neste contexto, as toxinas encontradas em organismos vivos revelam-se como uma grande promessa para alcançar estes objetivos. Existem vários exemplos de medicamentos cuja origem é direta ou indiretamente relacionada a fontes biológicas. Peptídeos produzidos por plantas, animais (vertebrados e invertebrados) e microrganismos, como uma estratégia de proteção, atualmente estão sendo utilizados como modelos para o desenho de novos fármacos com aplicações na área da saúde (REECE e MAXWELL, 1991; TROVATTI et al., 2008).

O uso de novas tecnologias para o desenvolvimento de medicamentos constitui uma estratégia promissora no campo da biotecnologia. Nesse sentido, peptídeos produzidos por plantas, animais e microrganismos estão sendo utilizados como modelos para o desenvolvimento de novos medicamentos. As toxinas intracelulares, produzidas por sistemas de morte pós-segregacional (PSK) em bactérias, tais como CcdB e ParE são exemplos recentes dessa estratégia (HAYES, 2003).

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, 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. Nas células que contém estes plasmídios, tanto a toxina quanto a antitoxina são sintetizadas de modo que ela permaneça viável, mas naquelas em que ele não está presente, a síntese de ambos deixa de acontecer. Como a antitoxina é menos estável que a toxina, ela é rapidamente degradada por proteases específicas, enquanto a toxina permanece estável na célula, causando assim, sua morte (Figura1.)

Figura 1. Representação esquemática da morte celular induzida por plasmídeo do sistema PSK. Temos em vermelho a toxina, em azul a antitoxina e em verde uma protease.



Fonte: Hayes, F. 2003 modificado.

Dentro desta incessante busca por novas estruturas antibióticas na biodiversidade brasileira, a toxina bacteriana CcdB constitui um exemplo importante da riqueza química e biológica associada a antibióticos de origem natural com potencial considerável, a qual exerce sua função sobre um grupo de enzimas alvo denominadas DNA topoisomerases.

1.1 DNA topoisomerases bacterianas: DNA girase e topoisomerase IV

Um grupo de enzimas que se tornaram alvos efetivos para agentes terapêuticos são as denominadas DNA topoisomerases. Estas enzimas estão presentes em todas as células (tanto as procarióticas, quanto eucarióticas), apresentando funções essenciais à viabilidade dos micro-organismos, sendo responsáveis por catalisar, no DNA, mudanças topológicas imprescindíveis para o metabolismo celular. Embora a sequência do DNA determine 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).

A DNA girase é um membro do grupo das enzimas bacterianas denominadas topoisomerases do tipo IIA, descoberta em *Escherichia coli* por Gellert e colaboradores em 1976, sendo responsável por controlar um processo bastante específico durante a replicação do DNA nas células. Esta classe de enzima difere-se de todas as demais topoisomerases por ser a única capaz de introduzir super-hélices negativas no DNA, promovendo seu superenovelamento. Como a DNA girase é encontrada somente nos organismos procariotos, sua importância como alvo de agentes antimicrobianos é indiscutível.

Em 1990, Kato e colaboradores, descobriram uma enzima homóloga da DNA girase, denominada topoisomerase IV. No entanto, estas enzimas diferem-se em um aspecto fundamental: DNA girase liga o DNA ao redor de si mesma, enquanto a topoisomerase IV não. Esta diferença sutil em seu modo de ação favorece a atividade de relaxamento do DNA, enquanto a DNA girase possui atividade maior no superenovelamento do DNA (CORBETT et. al., 2005). Assim sendo, com a descoberta da topoisomerase IV, tornou-se evidente que a DNA girase não é o único alvo intracelular efetivo para os diversos agentes terapêuticos. As características únicas apresentadas por estas enzimas tornam viáveis estudos de interação e

inibição enzimática através da análise da migração das diferentes formas do DNA, quando submetidas a um campo elétrico.

1.2 Sequências peptídicas com potencial antimicrobiano

Tem sido demonstrado, tanto *in vitro* como *in vivo*, que o alvo da toxina CcdB (Figura 2.) é a subunidade A da DNA girase (BERNARD e COUTURIER, 1992). Por outro lado, a escassez de dados relacionados a inibidores específicos para a ação da topoisomerase IV e, em especial, em relação ao efeito das toxinas CcdB frente à essa enzima, bem como o fato de que inibidores conhecidos de DNA girase somente exercem efeito inibitório na topoisomerase IV em concentrações muito superiores às convencionais (HASHIMI et al., 2007), é o que leva-se a considerar, também, esta enzima como alvo efetivo de derivados da toxina CcdB.

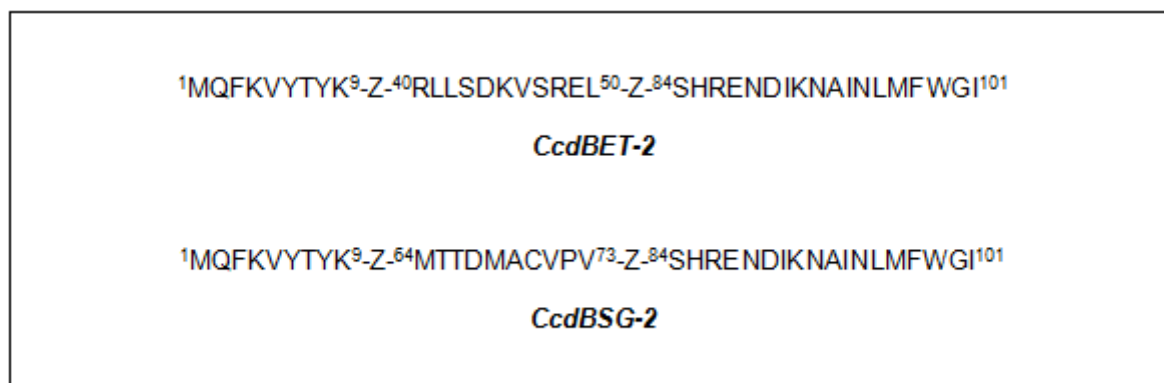
Figura 2. Estrutura primária da proteína natural CcdB de *Escherichia coli*.

¹MQFKVYTYKRESRYRLFVDVQSDIIDTPGRRMVIPLASARLLSDKVSRELYPVVHIGD
ESWRMMTTDSVPVSVIGEEVADLSHRENDIKNAINLMFWGI¹⁰¹

Fonte: Acervo pessoal.

Dentre os peptídeos derivados da toxina CcdB, dois análogos denominado CcdBET-2 e CcdBSG-2 (Figura 3.), desenvolvidos anteriormente em projetos paralelos, apresentaram resultados bastante interessantes. Ambos os peptídeos mostraram eficiência de inibição da atividade das enzimas DNA girase e topoisomerase IV. No entanto, não foi observado eficiência em estudos *in vivo* de inibição de crescimento bacteriano em ensaios realizados posteriormente.

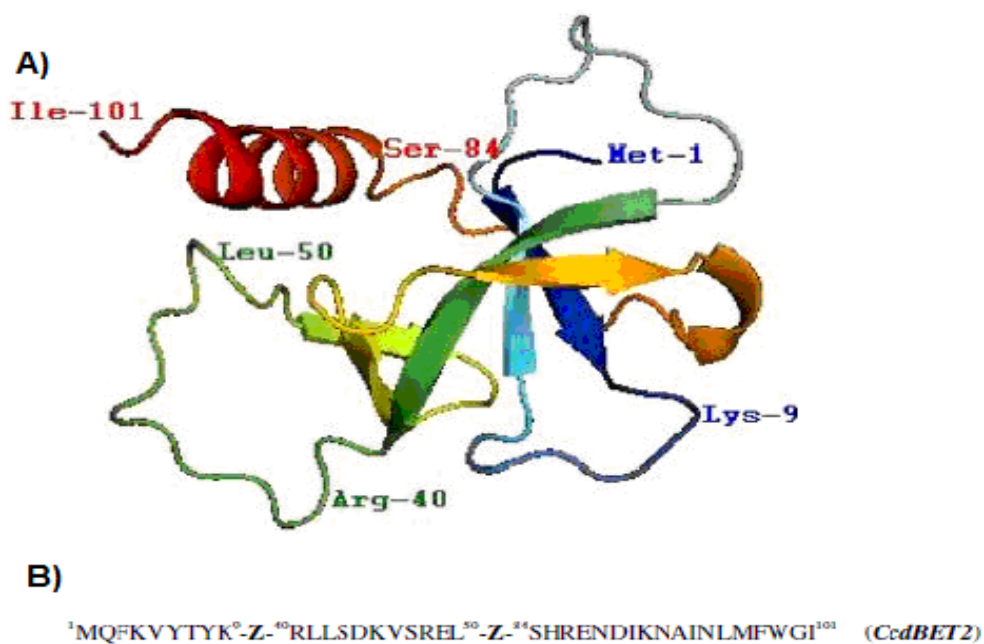
Figura 3. Estrutura primária dos análogos de CcdB utilizados neste trabalho.



Fonte: Trovatti, et al. 2008 modificado.

Em estudos realizados por Trovatti e colaboradores (2008), o análogo peptídico CcdBET-2 foi desenhado a partir de dois fragmentos da sequência proteica, um incluindo a folha lateral e outra incluindo uma folha- β na posição N-terminal, somados a sequência denominada CcdBET-1 localizada entre os resíduos de Ser84 até Ile101, a única região em α -hélice da estrutura do CcdB (Figura 4.).

Figura 4. Representação esquemática da estrutura proteica do CcdB (A). Estrutura primária do peptídeo sintético CcdBET2 (Z = ϵ -amino hexanóico) (B)



Fonte: Trovatti, et al. 2008 modificado.

Ensaios de eletroforese em gel de agarose mostraram atividade inibitória do análogo peptídico CcdBET-2 sobre as reações de superenovelamento da DNA girase e de relaxamento da topoisomerase IV (TROVATTI et al., 2008). De maneira muito semelhante o análogo CcdBSG-2 (Figura 3.) destaca-se por apresentar capacidade inibitória também para ambas as enzimas bacterianas em concentrações ainda menores em comparação com o análogo CcdBET-2.

Por este motivo, é importante demonstrar a capacidade real que estes análogos possuem em inibir o crescimento de diferentes espécies bacterianas através de ensaios de susceptibilidade de crescimento bacteriano em meio líquido, um método bastante conhecido para testes iniciais de eficiência clínica de novos fármacos.

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

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.

Testes *in vivo* com as sequências peptídicas baseadas na toxina bacteriana CcdB, demonstraram a incapacidade de inibição do crescimento celular bacteriano, fato este atribuído à dificuldade que estas moléculas apresentam na possível translocação através da membrana celular bacteriana. 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, para que as mesmas desenvolvam a resposta biológica esperada.

1.3 Sistemas de liberação controlada de fármacos

Conforme o avanço nas descobertas de novas 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.

Nos últimos anos, estudos envolvendo a procura por novos sistemas de encapsulação e liberação de fármacos vem sendo foco de muitos grupos de pesquisa de diferentes áreas, principalmente pela possibilidade de se estabelecer alternativas terapêuticas mais eficientes, as quais possibilitem administrar os fármacos com mais segurança e com efeitos colaterais minimizados. Neste mesmo contexto, alguns desses novos sistemas foram associados a estudos específicos de liberação controlada de moléculas peptídicas nos mais variados meios, estudos estes que revelaram como promissores a aplicação destas novas classes de biomoléculas em estudos terapêuticos (GARRIDO, 2007).

Dentre os diferentes tipos de sistemas de encapsulação e liberação de fármacos, ganharam destaques nos últimos anos, aqueles que possibilitam a formação de sistemas com tamanhos de partículas nanoestruturadas, como é o caso das nanoemulsões lipídicas e os lipossomas. Com isso, é possível a utilização destas tecnologias como ferramenta para possibilitar a mobilidade das moléculas peptídicas com potencial terapêutico promissor, com o objetivo principal no desenvolvimento de novas famílias de moléculas com grande

capacidade antibacteriana, reduzida toxicidade às células eucarióticas e menor tendência ao aparecimento de resistência bacteriana (GREGORIADIS, et. al. 1971).

Em meados da década de 60, 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. Em 1965, Bangham e colaboradores, desenvolveram as primeiras vesículas fosfolipídicas, as quais mais tarde foram nomeadas de lipossomas (BANGHAM, STANDISH, WATKINS, 1965; SESSA, WEISSMANN, 1968). Em 1971, 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 (GREGORIADIS; LEATHWOOD; RYMAN, 1971).

Os lipossomas podem ser definidos como associações coloidais de lipídeos anfipáticos, que se organizam espontaneamente em estruturas fechadas do tipo “concha esférica”. Podem ser preparados a partir de misturas lipídicas naturais extraídas e purificadas, ou a partir de lipídeos sintéticos, disponíveis comercialmente. Os lipossomas 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).

Quanto à composição, os lipossomas são preparados tendo como principal constituinte um fosfolipídio, como a fosfatidilcolina, podendo ser adicionado na formulação, um ou mais tipos diferentes de lipídios como estearilamina, colesterol, $L\alpha$ -fosfatidil-DL-glicerol, visando gerar carga a esta vesícula e, conseqüentemente, proporcionar maior adesão, estabilidade e interação da vesícula. Também tem se adicionado a formulação do lipossoma polímeros, como o polietilenoglicol (PEG), visando uma maior estabilidade da vesícula e maior tempo de

duração no organismo humano, uma vez que sua característica biodegradável se torna aumentada.

1.4 Testes de inibição de crescimento bacteriano

Para se testar a eficácia e a eficiência de sistemas de liberação de fármacos, como os lipossomas, se faz necessário a utilização de um ensaio de inibição de crescimento bacteriano uma vez que o peptídeo encapsulado em questão possui ação antibacteriana.

Para tanto, a utilização de metodologias convencionais como turbidimetria, teste utilizando resazurina, e diversos outros testes utilizando microplaca, não se mostram eficazes. O motivo disso está relacionado com a rápida degradação do lipossoma e da liberação de seus lipídeos no meio de análise sem uma remoção de tais componentes. Sendo assim, os lipídeos presente no meio interferem na leitura dos resultados gerando uma resposta não conclusiva. Uma vez que os resultados de tais testes já existentes levam em consideração a leitura da absorbância em comprimento de onda específico para crescimento celular (595 nm), é esperado como um resultado negativo uma baixa absorbância. Por outro lado, uma turvação de tal meio é o indicativo de presença bacteriana, o que corresponde ao resultado positivo, indicativo de crescimento bacteriano. Sendo assim mesmo uma pequena turvação do meio de cultura por parte da degradação dos lipídeos constituintes dos lipossomas, podem interferir significativamente os resultados deste ensaio.

Em uma situação em que no meio de cultura há mais do que somente bactérias como responsáveis pela turvação, como no caso da degradação dos lipossomas, o resultado obtido se torna maior do que o resultado real e não indica com precisão a quantidade de células que realmente estão ali presentes.

Na tentativa de solucionar esse problema, um novo método foi desenvolvido baseando-se em metodologias já descritas (WANG, H.; CHENG, H.; WANG, F.; WEI, D.; WANG, X.). Tal metodologia consiste na remoção do meio de cultura após o fim do teste para somente após proceder com a leitura dos resultados. Desse modo os interferentes são todos retirados, e o resultado obtido diz respeito somente a quantidade de células bacterianas que ainda estão presentes, apesar da ação do sistema de liberação, peptídeo encapsulado em lipossoma.

Como se pode perceber, a remoção do meio de cultura remove também conteúdos de degradação dos lipossomas, retirando todos os interferentes do meio de cultura e possibilitando uma leitura correta e precisa do quanto realmente o peptídeo introduzido no sistema de lipossomas é eficaz para morte bacteriana.

Para isso utiliza-se um revelador que muda de cor ao ser reduzido. Tal revelador de cor amarela inicialmente, se torna roxo quando em contato com enzimas específicas da respiração celular e indica a quantidade de células que se encontram vivas após o teste. Ao sabermos a quantidade de células que se encontraram vivas após o teste, pode-se conhecer de forma indireta quantas células morreram.

Com essa metodologia é possível conduzir testes bacterianos em meio de cultura com interferentes que impossibilitariam uma leitura precisa uma vez que todo o conteúdo proveniente de degradação de compostos são retirados antes da leitura. Assim, a elaboração de um método de inibição de crescimento bacteriano possibilitou a continuidade dos estudos de sistemas de liberação como os lipossomas e também promoveu os resultados finais desse trabalho.

2. OBJETIVOS

Encontrar e aperfeiçoar um modelo de liberação e entrega de fármacos compatível com os análogos CcdBET-2 e CcdBSG-2, que possibilite interação com o alvo celular localizado no interior da célula bacteriana.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Síntese, purificação e caracterização dos análogos peptídicos de CcdB

Os análogos peptídicos de *CcdB* utilizados neste trabalho, foram sintetizados anteriormente em trabalhos paralelos (TROVATTI et al. 2008 e GARRIDO S. S., 2007), de maneira manual através do método de síntese em fase sólida de acordo com o protocolo padrão que emprega o grupamento base-lábil Fmoc como protetor dos α -amino grupos de cada aminoácido, e derivados t-butílicos (t-Bu) para a proteção das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos trifuncionais. Para o acoplamento de cada aminoácido, foram utilizados Diisopropilcarbodiimida (DIC) e 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) como agentes de condensação em uma mistura de solventes contendo diclorometano (DCM) e dimetilformamida (DMF) em proporção 1:1 (v/v).

A eficiência das etapas de acoplamento de cada aminoácido foram monitorada pelo teste de ninidrina (KAISER et al., 1970) e, quando positivo (presença de 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.

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 (94,5%), água deionizada (2,5%), EDT (2,5%) e TIS (0,5%), a 25°C por 3 horas. Peptídeo, obtido após clivagem, denominado bruto, foi precipitado e lavado com éter dietílico gelado e centrifugado (seis vezes), dissolvido em solução aquosa de ácido acético 10% e liofilizado.

A purificação dos peptídeos foi efetuada por Cromatografia Líquida de Média Eficiência (CLME), usando uma coluna de fase reversa Nucleosil C18 (25 x 2,5 cm; 15 µm; 300 Å) com um gradiente convexo de componente orgânico (acetonitrila; água; 0,04% TFA) variável, fluxo de 2,0 mL/min e detecção a 220 nm. CLAE analítica foi feita em um cromatógrafo Varian ProStar, empregando uma coluna de fase reversa Nucleosil C18 (25 x 0,46 cm; 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 1,5 mL/min e detecção a 220 nm.

A caracterização dos produtos após purificação foi feita através da determinação da massa molecular dos mesmos, empregando espectrometria de massas (ES-MS positivo) em equipamento AmaZon SL (Bruker®). Finalmente foi obtido após todo o processo de síntese, clivagem e purificação dos análogos quantidades suficientes para que todos os testes desde trabalho pudessem ser realizados.

3.2 Síntese de lipossomas do tipo SUV por extrusão e avaliação da encapsulação de moléculas peptídicas

Lipossomas do tipo SUV (small unilamellar vesicles) apresentando diâmetros próximos a 100 nm foram sintetizados através da metodologia de extrusão-evaporação.

As misturas de lipídeos correspondentes a cada uma das formulações, 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 foram utilizados os análogos CcdBET-2 e CcdBSG-2.

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 a sua conversão em vesículas unilamelares pequenas (SUV), os MLV foram submetidos à extrusão (30-40 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 correlato 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 eram obtidos após 30 ciclos de extrusão, mantendo-se constante mesmo após 60 ciclos.

Os valores de cada lipídeo utilizado para a elaboração dos diversos lipossomas pode ser visto na Tabela 1.

Tabela 1. Composições lipídicas propostas para os lipossomas sintetizados.

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

*Cada valor está expresso como uma proporção molar

**Formulação sem colesterol

Fonte: Elaborado pela autora.

A eficiência de encapsulação do peptídeo para 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 e frações contendo somente peptídeos livres que não sofreram encapsulação.

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 500nm, 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, tanto para o CcdBET-2 quanto para o CcdBSG-2.

3.3 Ensaios hemolíticos envolvendo os análogos peptídicos CcdBET-2 e CcdBSG-2

Os ensaios hemolíticos foram realizados utilizando amostra de sangue fresco, obtido por meio da doação de um voluntário. A realização envolve três etapas, descritas a seguir.

3.3.1 Preparo da solução de eritrócitos

Após a coleta da amostra, foi preparada a solução de eritrócitos adicionando 1mL de sangue em tubo tipo eppendorf, completando-se o volume com tampão PBS (1,53 g Na_2HPO_3 + 0,81 g $\text{H}_2\text{O}.\text{NaH}_2\text{PO}_4$ + 4,4 NaCl adicionados a 500 mL de água MiliQ). O tubo foi levado a uma micro centrífuga por 3 minutos a 3000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e novamente completou-se o volume do tubo com tampão PBS levando novamente á centrífuga.

Este procedimento foi repetido por quatro vezes, tendo-se assim ao final do processo sangue livre de sua fração plasmática contendo somente a solução de eritrócitos. Em seguida 50 μL da solução de eritrócitos foi passada para outro tubo tipo eppendorf juntamente com 950 μL de tampão PBS. Obtendo por fim, a preparação de células requerida para o ensaio.

3.3.2 Preparo e realização do ensaio hemolítico com os peptídeos a serem avaliados

Foi avaliado a capacidade hemolítica dos análogos CcdBET-2 e CcdBSG-2, para isso preparou-se soluções com diferentes concentrações desses peptídeos, sendo elas 100 μM , 50 μM , 25 μM e 12,5 μM . Para a diluição dos peptídeos foi usado tampão PBS. Prepararam-se também os controles positivos e negativos do teste utilizando 100 μL de tampão PBS em um tubo tipo eppendorf representando 0% de hemólise, uma vez que o tampão PBS conserva as células e não as agride sendo este o controle negativo, e 10 μL de Triton 1% juntamente com 90 μL de tampão PBS, representando 100% de hemólise, pois “Triton” é um composto que rompe a membrana plasmática das células por ser um forte emulsificador de lipídeos, assim este é o controle positivo do teste.

Ao final desse processo de preparação das amostras a serem testadas, obtém-se sete tubos (cinco contendo as soluções dos peptídeos e dois com os controles positivo e negativo).

A cada um desses tubos adiciona-se 100µL da solução de eritrócitos previamente preparada e por fim incuba-se todas as amostras em banho a 37°C por 1 hora.

Após esse tempo, centrifugaram-se as amostras por 3 minutos a 3000rpm, o sobrenadante foi retirado (retira-se o mesmo volume para todos os tubos) e colocou-se em microplaca de 96 poços com fundo chato para leitura em leitor de microplacas a 540 nm.

3.3.3 Análise dos resultados e cálculo da porcentagem de hemólise

Obtido o valor das leituras das amostras no leitor de microplacas, fez-se o cálculo e avaliou-se a capacidade hemolítica e a toxicidade dos compostos testados. Calcula-se a porcentagem de hemólise através da Figura 5. abaixo. Na qual “A” representa a absorbância obtida na leitura das microplacas e “Triton” e “PBS” representam as leituras obtidas nos controles positivo e negativo, respectivamente.

Figura 5. Fórmula para cálculo de porcentagem de hemólise.

$$\% \text{ de hemólise} = \frac{(A \text{ amostra} - A \text{ PBS})}{(A \text{ Triton} - A \text{ PBS})} \times 100$$

Fonte: Acervo pessoal.

Os resultados desse teste indicam a porcentagem de células que sofreram hemólise, ou seja, a quantidade de células que romperam sua membrana plasmática quando em contato com a substância testada, no caso os análogos peptídicos.

3.4 Ensaios de inibição de crescimento bacteriano em meio líquido utilizando peptídeos encapsulados em lipossomas

Para a realização dos testes de inibição de crescimento bacteriano em meio líquido, utilizou-se os análogos peptídicos CcdBET-2 e CcdBSG-2, encapsulados em quatro formulações de lipossomas: lipossoma positiva com colesterol, lipossoma positiva sem colesterol, lipossoma neutra e lipossoma contendo PEG. Testou-se a eficiência de tais sistemas frente a duas variedades de bactérias, *Staphylococcus aureus* (ATCC: 14458; Lote: 1007005) e *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) (ATCC 43895 – Lote: 0507171), sendo a primeira gram positiva e a segunda gram negativa. Tais bactérias foram escolhidas devido a sua importância médica e também devido a sua resistência a antibióticos já utilizados na clínica.

Para iniciar o teste, cultivou-se em uma placa contendo meio sólido Muller Hinton (Mueller Hinton 22 g/L – Biolog MHB 10608) uma quantidade de bactérias durante 24 horas, em estufa a 35°C. Após o tempo de crescimento, realizou-se a preparação do inóculo inicial, para o qual era diluído em aproximadamente 7mL meio de cultura líquido uma quantidade de bactérias retiradas da placa de cultura com auxílio de uma alça de platina. Em seguida a absorbância do meio era lida em Espectrofotômetro- 600nm, sendo que o valor padronizado da leitura do meio líquido sempre deveria estar entre 0,010nm-0,180nm, valores que indicam a presença de aproximadamente $1,5 \times 10^5$ UFC/mL.

Após, eram preparados os controles negativo e positivo. Para o controle negativo utilizou-se 200µL de suspensão bacteriana (inóculo já padronizado) juntamente com 100µL de antibiótico na concentração de 100µM adicionados em tubo do tipo eppendorf. Para os testes com *Staphylococcus aureus* utilizou o antibiótico Novobiocina e para os testes com *Escherichia coli* enterohemorrágica utilizou o antibiótico Ciprofloxacino também em uma

concentração de 100 μ M. Para o controle positivo utilizou-se somente 200 μ L de suspensão bacteriana do inoculo inicial, também adicionados em um tubo do tipo eppendorf.

Para a preparação dos compostos a serem testados utilizou-se 4 quantidades diferentes de lipossomas encapsuladas com os análogos de estudo. Assim adicionou-se em um tubo do tipo eppendorf 200 μ L de suspensão bacteriana juntamente com 10 μ L de solução de lipossoma, após 50 μ L de solução de lipossoma e assim sucessivamente com 100 μ L e 150 μ L. Foi testada também a capacidade de inibição bacteriana do peptídeo livre em solução, não encapsulado, e juntamente foi testada a capacidade de inibição de lipossoma branco, sem peptídeo em seu interior. Para isso preparou um tubo do tipo eppendorf contendo 200 μ L de suspensão bacteriana juntamente com 49 μ L de solução contendo CcdBET-2 livre, e para o teste com CcdBSG-2 92,5 μ L de peptídeo livre gerando uma concentração final de 100 μ M de peptídeo. E em outro tubo tipo eppendorf adicionou-se além dos 200 μ L de suspensão bacteriana, 100 μ L de lipossoma branco.

Em seguida a preparação de todos os tubos, estes foram levados para estufa por 3 horas a 35°C. Tempo necessário para crescimento bacteriano e possível inibição de crescimento pelos sistemas testados. Após esse tempo, os tubos foram retirados da estufa e foi adicionado em cada solução de MTT (3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio brometo), 20 μ L. Em seguida, foram incubados em estufa a 35°C por mais 30 minutos, tempo para que a redução do MTT contido no tubo fosse completa.

Após esse tempo, retirou-se os tubos da estufa e levou-os para centrifuga a 10.000 RPM por 60 segundos. Em seguida o sobrenadante foi retirado, retirando todos os interferentes do processo, como lipossomas degradados e células bacterianas, e restou no fundo dos tubos cristais de coloração roxa que foram dissolvidos em 500 μ L de DMSO. Em seguida a solução de 500 μ L de DMSO foi transferida para tubos de ensaio estéreis nos quais foram adicionados mais 2000 μ L de DMSO.

Para finalizar o teste, o conteúdo dos tubos de ensaio foram lidos em Espectrofotômetro – 550nm, e em seguida os valores obtidos foram reunidos em gráficos de barras.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

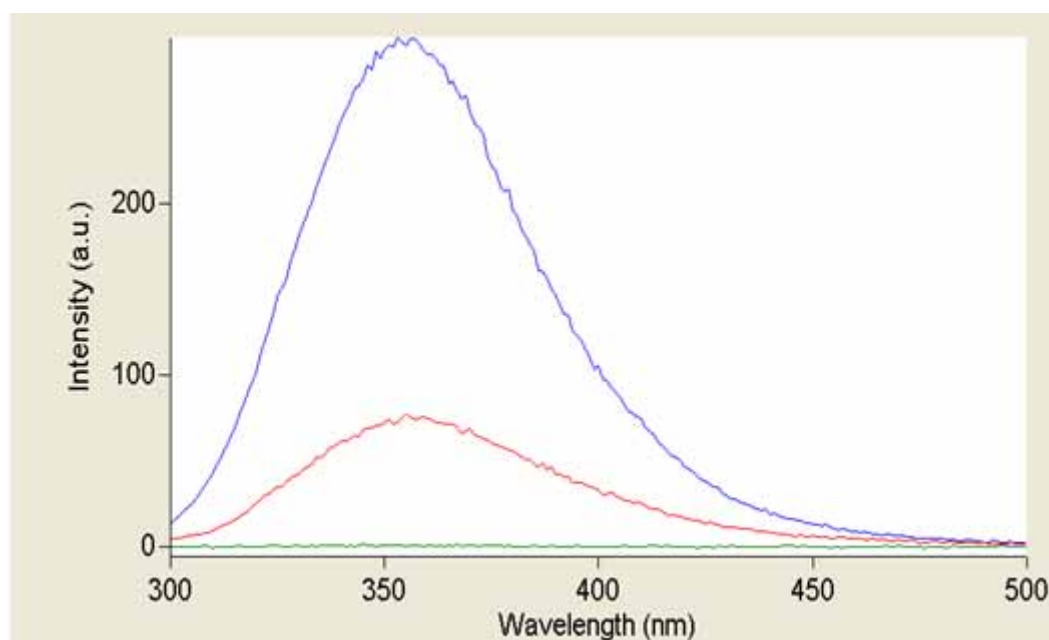
4.1 Síntese de lipossomas do tipo SUV por extrusão e avaliação da encapsulação de moléculas peptídicas.

Após o preparo de cada formulação, estudos de eficiência de encapsulação foram realizados utilizando uma associação de técnicas cromatográficas. A Cromatografia de Gel Filtração foi utilizada para separar as frações contendo lipossomas com peptídeo compartimentalizados e frações contendo apenas peptídeo não encapsulado livre em solução. 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 290 nm e emitir fluorescência num comprimento de onda em torno de 360 nm. Isto permite analisarmos quantitativamente a eficiência do método de encapsulação de peptídeo para cada composição de lipossomas.

Podemos exemplificar este comportamento através da análise da Figura 6, a qual representa um experimento demonstrativo do comportamento do espectro de emissão de fluorescência dos sistemas estudados. É possível observar que nas frações contendo

lipossomas com peptídeo encapsulado (ou compartimentalizado), não há emissão de fluorescência correspondente ao resíduo de triptofano. Este fato pode ser explicado pela não emissão do sinal de fluorescência deste aminoácido causado pela micela lipídica dos lipossomas (comportamento da curva em verde). 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).

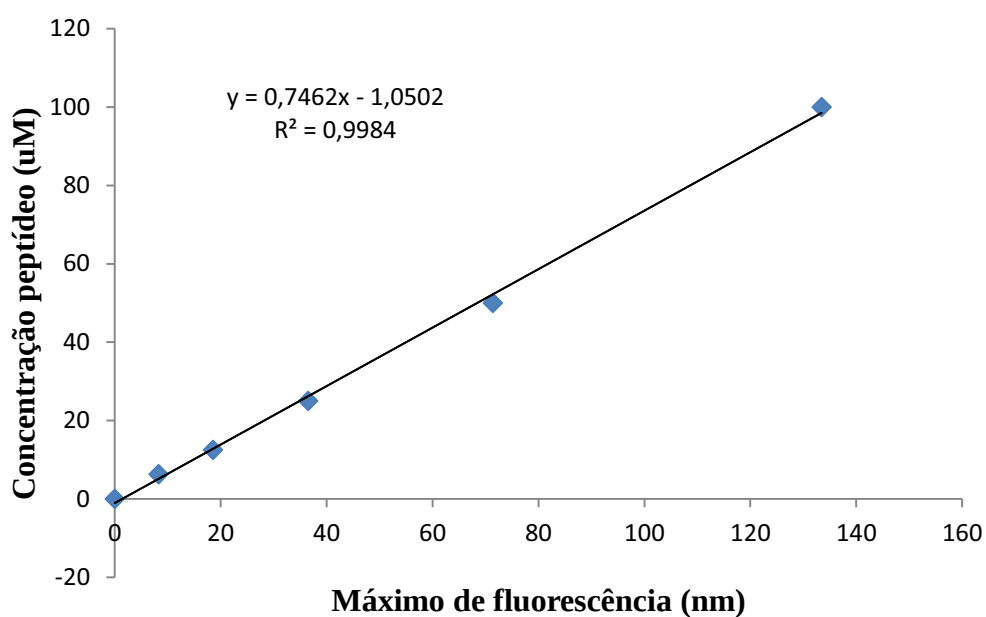
Figura 6. Comparação entre as curvas de fluorescência de diversas amostras, após cromatografia. Curva de fluorescência mostrando o máximo de fluorescência para uma solução de concentração 100 μM de *CcdBET-2* (azul); o máximo em fluorescência para uma das amostras coletadas da coluna de cromatografia contendo somente peptídeo livre (vermelho); curva correspondente a uma fração contendo lipossomas com peptídeo encapsulado (verde).



Fonte: Acervo pessoal.

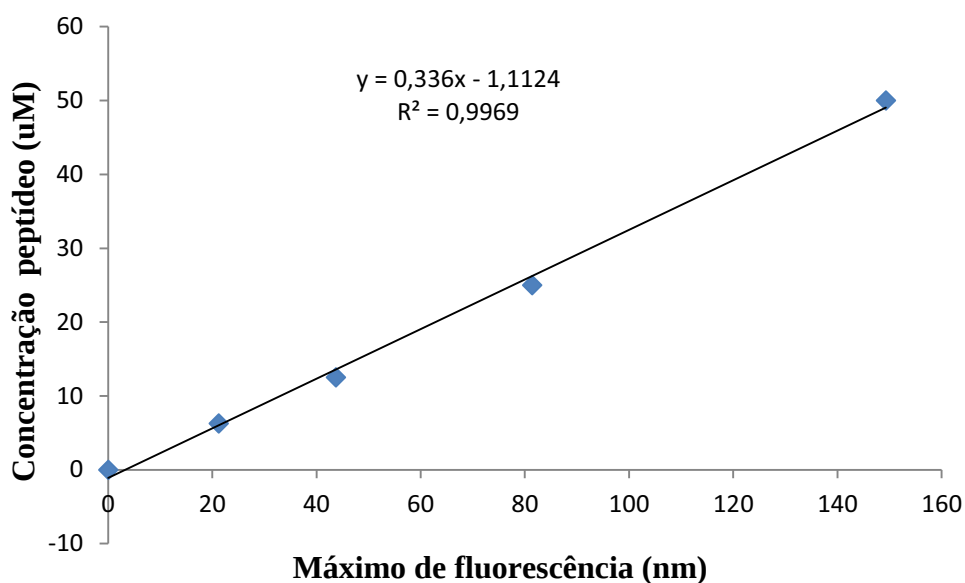
Para análise quantitativa entre as frações obtidas em cada ensaio, foi elaborada uma curva padrão utilizando soluções de diferentes concentrações do peptídeo e os valores máximos de emissão de fluorescência de cada uma dessas soluções. Tais curvas podem ser observadas nas figuras abaixo. (Figura 7. e Figura 8.)

Figura 7. Gráfico da curva padrão da concentração molar de CcdBET-2 por máximo de fluorescência.



Fonte: Acervo pessoal.

Figura 8. Gráfico da curva padrão da concentração molar de CcdBSG-2 por máximo de fluorescência.

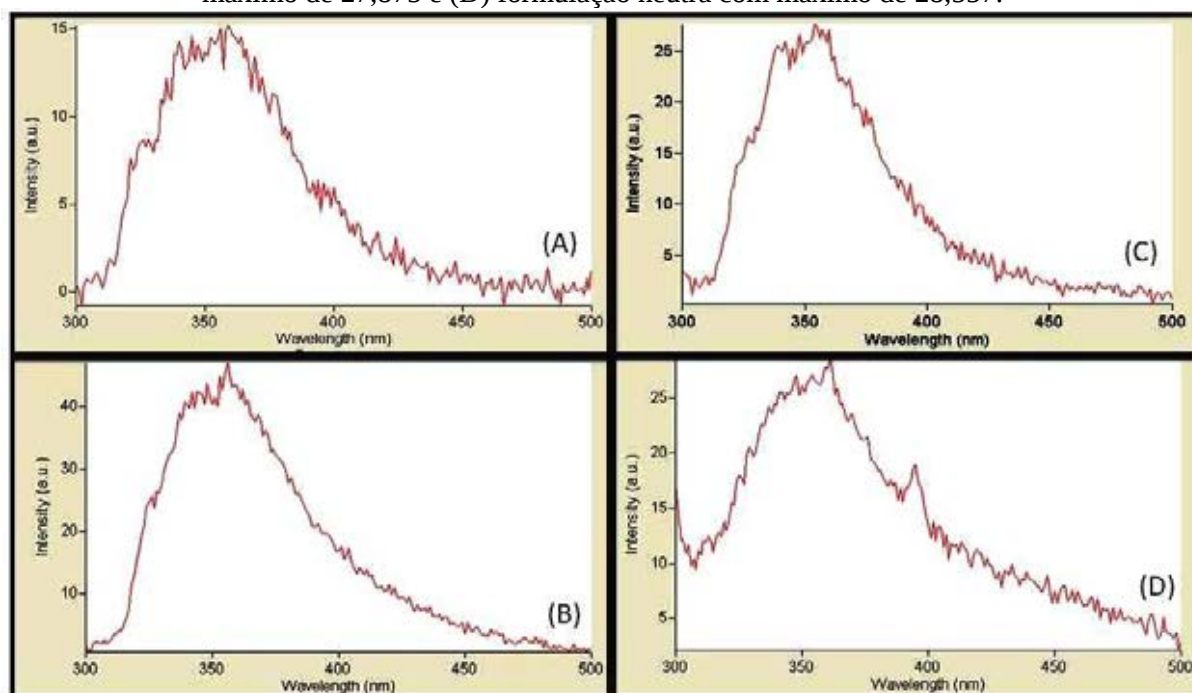


Fonte: Acervo pessoal.

Através da curva padrão, pode-se calcular a quantidade de peptídeo que não estava encapsulado no lipossoma e a partir disso chegar ao valor de peptídeo que estava contido no lipossoma, através de uma porcentagem de encapsulação, gerando os resultados de eficiência descritos na Tabela 2.

Para obter tais valores, gráficos de máximo de fluorescência foram gerados para cada fração obtida através da coluna de cromatografia e para cada formulação de lipossoma. Através deles foi possível obter o resultado de máximo de emissão de fluorescência total, que foi substituído na curva padrão do respectivo peptídeo e por fim obtido a porcentagem final de eficiência de encapsulação. Como pode ser observado nas figuras abaixo (Figura 9. e Figura 10.), que representam um exemplo das frações que continham peptídeo livre em solução para ambos os peptídeos.

Figura 9. Exemplos de gráficos obtidos após a leitura das frações contendo CcdBET-2. Temos em (A) formulação positiva sem colesterol com máximo de fluorescência de 16,988; (B) Formulação positiva com colesterol com máximo de 47,040; (C) formulação contendo PEG com máximo de 27,875 e (D) formulação neutra com máximo de 28,557.

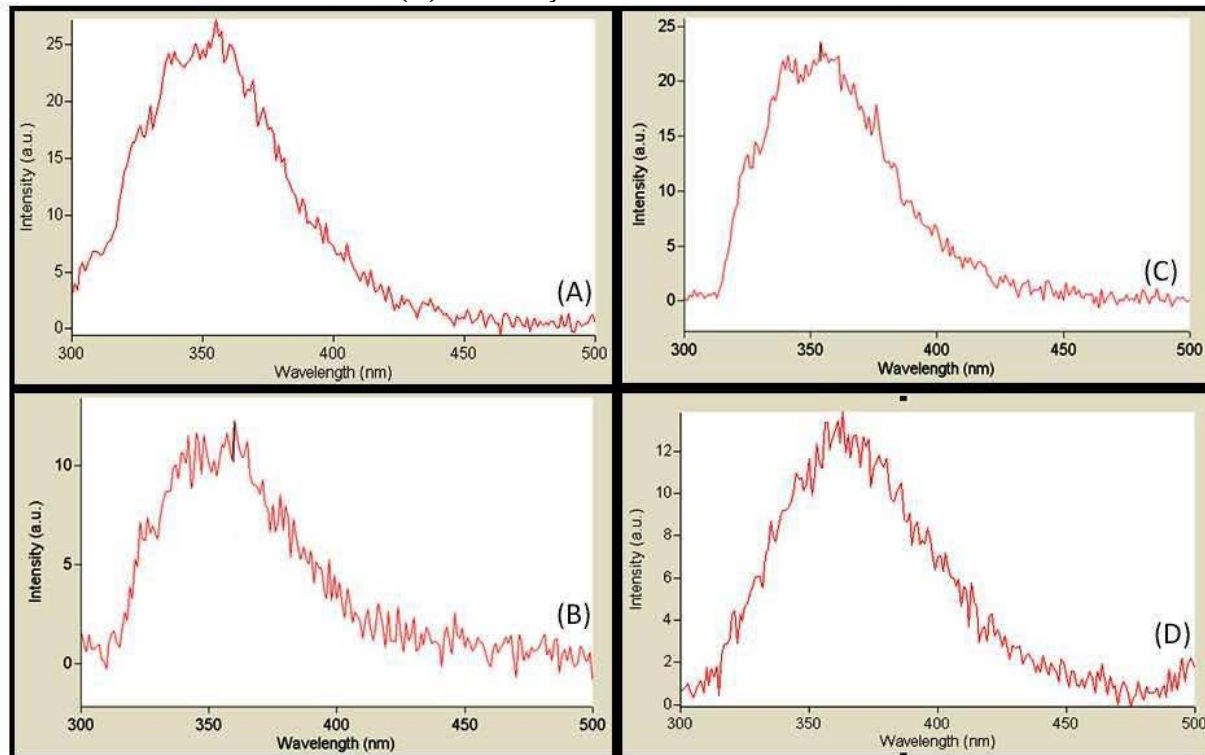


Fonte: Acervo pessoal.

Estas imagens constituem somente um exemplo de uma das frações contendo peptídeo livre. Na realização do testes, algumas outras frações também apresentaram perfil de gráfico semelhantes a esses, diferenciando somente nos valores de máximo de fluorescência. Para chegar ao resultado final da eficiência de encapsulação, ao valores máximos de todos os gráficos obtidos com esse perfil foram somados, e substituídos na curva padrão obtida. Para cada formulação de lipossoma obteve-se um grupo de gráficos com esse perfil e valores de máximos diferentes.

Também realizou-se o mesmo estudo para o outro análogo, CcdBSG-2. Um exemplo dos gráficos e dos valores máximos de fluorescência para frações com peptídeos livres podem ser observados na Figura 10.

Figura 10. Exemplos de gráficos obtidos após a leitura das frações contendo o análogo CcdBSG-2. Temos em (A) Formulação positiva sem colesterol com máximo de fluorescência de 27,236; (B) Formulação positiva com colesterol com máximo de 12,282; (C) Formulação contendo PEG com máximo de 23,579; (D) Formulação neutra com máximo de 12,636.



Fonte: Acervo pessoal.

Da mesma forma que para o análogo CcdBET-2, foram obtidos vários gráficos que apresentaram esse perfil de emissão de fluorescência. Assim, para uma mesma formulação de lipossoma os valores máximos foram somados e substituídos na curva padrão, gerando os resultados finais apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Comparação dos resultados de eficiência de encapsulação obtidos para os peptídeos análogos deste projeto.

Peptídeo	Formulações dos lipossomas			
	Lipossoma (+)	Lipossoma (PEG)	Lipossoma (Ø)	Lipossoma (+) *
CcdBET-2	55%	40%	50%	60%
CcdBSG-2	80%	70%	85%	56%

*sem colesterol

Fonte: Elaborado pela autora.

Como pode ser observado, os resultados finais de eficiência de encapsulação são diferentes para ambos os análogos e também para as diferentes formulações de lipossomas. De modo geral para o análogo CcdBET-2 os resultados foram menores se comparados ao análogo CcdBSG-2, que apresentou resultados mais altos e melhores.

Isso pode ser explicado pela presença de diferentes componentes nos lipossomas que possivelmente influenciam na facilidade ou dificuldade de compartimentalizar os peptídeos.

Por exemplo, formulações positivas possuem em sua composição lipídeos que conferem carga residual positiva a vesícula, como no caso da estearilamina presente na formulação denominada Lipossoma (+). E nesse caso, pode-se dizer que peptídeos possuindo carga residual bastante positiva encontrarão dificuldade para interagir com tal vesícula. Como o análogo CcdBET-2, que por possuir carga residual positiva maior do que o CcdBSG-2 apresenta resultados de eficiência mais baixos para essa formulação se comparado com

CcdBSG-2, que apresenta 80% de eficiência. Para a lipossoma com PEG, os resultados para o CcdBSG-2 também foram maiores, devido ao mesmo motivo. Pois, apesar de conter PEG em sua composição, que confere a esta vesícula uma maior estabilidade em meio fisiológico, também contém estearilamina, conferindo carga residual positiva para sua membrana e dificultando uma possível interação com peptídeos mais positivos.

A mesma situação se repete para o lipossoma neutro. Esta formulação contém um lipídeo que confere a sua membrana externa uma característica neutra, possivelmente isenta de cargas positivas ou negativas. E teoricamente deveria incorporar melhor peptídeos como o CcdBET-2, possuidor de carga positiva mais acentuada. No entanto, o observado é uma maior eficiência para o análogo CcdBSG-2, gerando a hipótese de que mesmo conferindo a membrana uma menor presença de cargas, a presença da estearilamina ainda interfere na incorporação do peptídeo, uma vez que gera cargas positivas para a vesícula.

O contrario pode ser dito do análogo CcdBSG-2, pois apesar de estruturalmente semelhante ao CcdBET-2, este primeiro contém uma região (do resíduo 64 ao 73 de aminoácidos) diferente do CcdBET-2. Esta diferença confere ao CcdBET-2 uma carga global muito mais positiva (+3,1) do que o CcdBSG-2 com carga de (+1). Essa diferença de cargas influencia diretamente na eficiência de encapsulação, dando indícios de quanto mais carga (no caso positiva), mais difícil é a encapsulação obtendo um valor menor de eficiência. Que corresponde ao que foi observado nos resultados apresentados.

4.2 Ensaios hemolíticos envolvendo os análogos peptídicos CcdBET-2 e CcdBSG-2

Para a realização desses ensaios foi utilizado somente solução de peptídeos livres solubilizados em tampão TRIS.HCl 10 mM juntamente com tampão PBS. Não foram

testados os peptídeos encapsulados em lipossomas, pois essas estruturas são extremamente semelhantes à membrana plasmática celular, sendo biodegradável no meio utilizado. Por esse motivo a realização de testes com os peptídeos encapsulados resultariam em valores não confiáveis, já que a técnica utilizada baseia-se em leituras de absorbância em comprimento de onda que é absorvido pela composição lipídica dos lipossomas, podendo gerar resultados incorretos. Para isso os ensaios hemolíticos foram realizados em duplicata para cada um dos peptídeos analisados. As microplacas foram submetidas à leitura em 540 nm (Figura 11 e 12). Os resultados obtidos foram organizados em tabelas para melhor visualizar o perfil da porcentagem hemolítica comparado com a concentração de peptídeo.

Figura 11. Microplaca contendo as amostras referentes ao teste hemolítico para CcdBSG-2. Temos: poços (A1) Triton mais solução de eritrócitos; (A2) PBS mais solução de eritrócitos; (A4) (A5) (A6) (A7) sequência das concentrações de peptídeos 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 12,5 μ M juntamente com solução de eritrócitos.



Fonte: Acervo pessoal.

Observa-se claramente por meio desta figura (Figura 11) que o controle positivo do teste gera 100% de hemólise, isto porque a solução após incubação em 37°C está vermelha intensa indicando o rompimento da célula e o extravasamento do conteúdo intracelular, que no caso das hemácias é o pigmento de coloração avermelhada, hemoglobina. Em contraste percebe-se que o controle negativo do teste também está correto, gerando 0% de hemólise, uma vez que a coloração da solução manteve-se límpida sem extravasamento de conteúdo intracelular e sem rompimento de membrana plasmática.

A figura acima (Figura 11) indica o teste de hemólise referente ao peptídeo CcdBSG-2.

2. Após a leitura da microplaca obteve-se os respectivos valores de absorbância e porcentagem de hemólise indicados na Tabela 3.

Tabela 3. Resultados para CcdbSG-2 dos testes de hemólise.

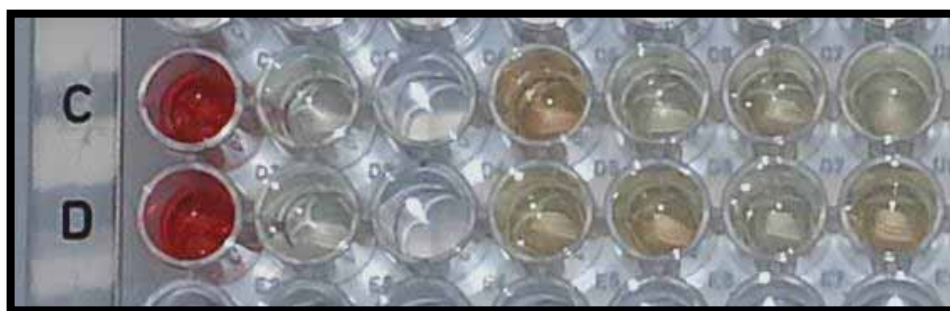
Resultados – CcdBSG-2		
Concentrações (µM)	Absorbância (nm)	% Hemólise
100	0,234	11,55
50	0,131	4,56
25	0,117	3,62
12,5	0,084	1,41

Fonte: Elaborado pela autora.

Pode-se concluir que as porcentagens de hemólises resultaram em valores baixos, sendo a maioria abaixo de 10%. Isso indica que o peptídeo em questão não possui ação hemolítica significativa em células sanguíneas humanas.

A mesma análise foi feita para o peptídeo CcdBET-2, e foi obtido as respectivas porcentagens de hemólise após leitura da microplaca contendo as amostras após incubação em banho a 37°C (Figura 12)

Figura 12. Amostras contendo peptídeo CcdBET-2. Temos da esquerda para a direita; Triton mais solução de eritrócitos; PBS mais solução de eritrócitos; sequência das concentrações de peptídeos 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM juntamente com solução de eritrócitos. Na linha de baixo o teste realizado em duplicata.



Fonte: Acervo pessoal.

Percebe-se também que neste teste os controles funcionaram corretamente, indicando a leitura de 100% de hemólise e a leitura de 0% de hemólise. Na indicação “ $(A_{Triton} - A_{PBS})$ ” utilizam-se os valores das leituras dos controles, respectivamente negativo e positivo. O valor dessas leituras para o teste com CcdBSG-2 foi de 0,063 nm para PBS e 1,552 nm para Triton. E para o teste com CcdBET-2 foi de 0,067 nm para PBS e 1,799 nm para Triton. Assim, utilizando a fórmula representada na Figura 5, calculou-se a porcentagem de hemólise para cada uma das concentrações utilizadas do peptídeo CcdBET-2, representados na Tabela 4.

Tabela 4. Resultados obtidos para porcentagem de hemólise de CcdBET-2.

Resultados – CcdBET-2		
Concentrações (µM)	Absorbância (nm)	% Hemólise
100	0,201	7,00
50	0,152	4,72
25	0,118	2,66
12,5	0,101	1,77

Fonte: Elaborado pela autora.

A partir desses resultados, percebeu-se que não há valores acima de 10% de hemólise, indicando mais uma vez que o peptídeo CcdBET-2 também não apresenta toxicidade celular, e não agride a membrana das células sanguíneas humanas. Estes resultados indicam que ambos os peptídeos estudados, não apresentam toxicidade significativa em eritrócitos humanos, o que é bastante desejado para aplicação de antibióticos, já que os efeitos colaterais associados ao tratamento com estes compostos seriam minimizados.

Podemos concluir com estes resultados que ambos os peptídeos estudados neste trabalho, possuem características desejáveis para futuros fármacos. Obviamente, serão necessárias novas etapas de estudos para a aplicação efetiva desses compostos em terapêutica, porém neste projeto pudemos realizar estudos que efetivamente demonstraram o potencial que moléculas peptídicas podem apresentar comparadas com fármacos convencionais, o que é de suma importância na área de desenvolvimento de novos fármacos.

4.3 Ensaios de inibição de crescimento bacteriano em meio líquido utilizando peptídeos encapsulados em lipossomas.

Para a realização dos testes utilizou-se um revelador, o MTT ((3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio brometo), um sal de coloração amarela quando dissolvido em solução aquosa. Este sal possui a capacidade de sofrer redução, quando em contato com células vivas, as quais estão consumindo o oxigênio do meio para realizar suas atividades metabólicas. Desse modo o MTT se reduz, produzindo cristais de coloração púrpura, insolúvel ao meio aquoso, que se depositam no fundo do recipiente, em seguida esses cristais são dissolvidos utilizando DMSO e a absorbância é lida em 550nm, obtendo diferentes valores baseado na intensidade da coloração e concentração dos cristais. Os ensaios foram feitos em triplicata, e a média das absorbâncias para cada grupo estão descritas nas tabelas a seguir (Tabelas de 5 a 8). Os resultados obtidos foram analisados qualitativamente e quantitativamente através de gráficos e tabelas. Nas tabelas abaixo constam um exemplo dos resultados obtidos após a leitura da absorbância dos cristais solubilizados em DMSO. Tais dados foram analisados e através de comparações com o controle negativo, representando 100% de células mortas, e o controle positivo, representando 0% de células mortas, obteve-se as quantidades indicadas nas Tabelas 9 e 10. Assim, pode-se comparar os resultados entre as formulações de lipossomas e os análogos utilizados

Tabela 5. Resultados das absorbâncias (550nm) obtidas nos ensaios de inibição de crescimento bacteriano para *Staphylococcus aureus* utilizando CcdBET-2.

<i>Staphylococcus aureus</i>					
Lipossoma (+) com colesterol / CcdBET-2					
Controle (+)	Controle (-)	Lipossomas		Peptídeo livre	Lipossoma branco
0,458	0,234	10 µL	0,620	0,438	0,606
		50 µL	0,196		
		100 µL	0,198		
		150 µL	0,093		

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 6. Resultados das absorvâncias (550nm) obtidas nos ensaios de inibição de crescimento bacteriano para *Staphylococcus aureus* utilizando CcdBSG-2.

<i>Staphylococcus aureus</i>					
Lipossoma (+) com colesterol / CcdbSG-2-2					
Controle (+)	Controle (-)	Lipossomas		Peptídeo livre	Lipossoma branco
0,490	0,188	10 µL	0,635	0,536	0,614
		50 µL	0,140		
		100 µL	0,121		
		150 µL	0,093		

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 7. Resultados das absorvâncias (550nm) obtidas nos ensaios de inibição de crescimento bacteriano para *Escherichia coli* enterohemorrágica utilizando CcdBSG-2.

<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica					
Lipossoma (+) com colesterol / CcdbSG-2					
Controle (+)	Controle (-)	Lipossomas		Peptídeo livre	Lipossoma branco
1,403	0,098	10 µL	1,453	1,628	1,573
		50 µL	1,223		
		100 µL	1,169		
		150 µL	1,145		

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 8. Resultados das absorvâncias (550nm) obtidas nos ensaios de inibição de crescimento bacteriano para *Escherichia coli* enterohemorrágica utilizando CcdBET-2.

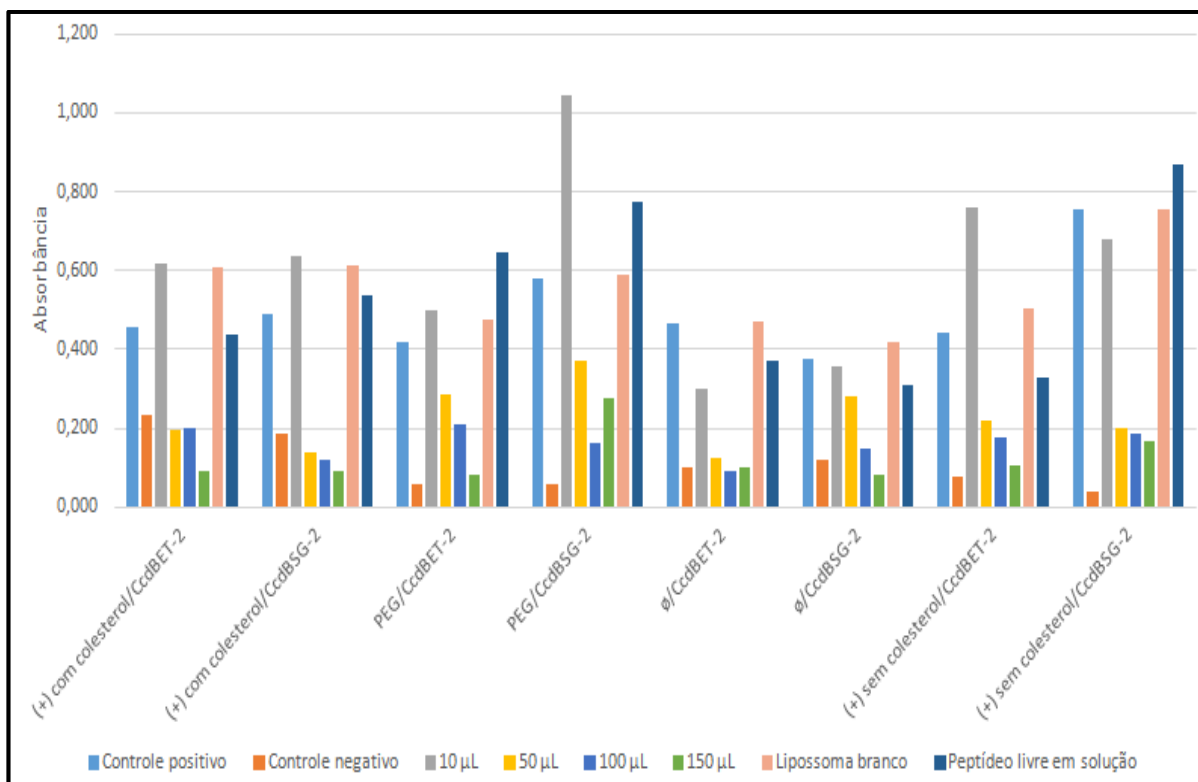
<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica					
Lipossoma (+) com colesterol / CcdBET-2					
Controle (+)	Controle (-)	Lipossomas		Peptídeo livre	Lipossoma branco
0,946	0,030	10 µL	0,559	1,061	0,979
		50 µL	0,507		
		100 µL	0,428		
		150 µL	0,398		

Fonte: Elaborado pela autora.

Todas as formulações foram testadas, utilizando ambos os análogos peptídicos. De forma geral podemos perceber que a melhor formulação lipossomal que de forma indireta

matou a maior quantidade de células bacterianas é a formulação neutra (Figura 13.). E o análogo mais eficaz para produzir morte bacteriana é o CcdBET-2. Pode-se perceber também, através dos resultados, que o peptídeo livre em solução não é capaz de matar as células bacterianas assim como somente o lipossoma branco (Figura 13.). Analisando quantitativamente as porcentagens de células inibidas pelo sistema peptídeo-lipossoma (Tabela 9. e 10.) confirma-se que a melhor formulação é a de lipossoma neutra com valores de 80,86% para um volume de 100 μ L, e também o resultado para um volume menor, como o de 10 μ L, mostrou significativa inibição em relação a outras formulações com 35,48% de células bacterianas mortas. Como uma conclusão final, pode-se dizer que o sistema peptídeo-lipossoma é eficaz contra bactérias gram positivas, no caso *Staphylococcus aureus*, e que em todos os casos houve considerável diminuição da quantidade de células inicial, dando indícios de que o sistema peptídeo-lipossoma é o responsável pela morte bacteriana, em todos os casos.

Figura 13. Resultados dos testes utilizando *Staphylococcus aureus*, cada agrupamento de barras representa um teste realizado com uma formulação de lipossoma encapsulada a um análogo.



Fonte: Acervo pessoal.

Tabela 9. Porcentagem de inibição de crescimento bacteriano para *Staphylococcus aureus* utilizando o análogo CcdBET-2.

CcdBET-2				
<i>Staphylococcus aureus</i>				
Volume	Lipossoma (+)	Lipossoma PEG	Lipossoma neutra	Lipossoma (+) sem colesterol
10 µL	0,00%	0,00%	35,48%	0,00%
50 µL	57,20%	31,17%	73,54%	50,67%
100 µL	56,78%	49,64%	80,86%	60,13%
150 µL	79,69%	80,09%	78,27%	24,09%

Fonte: Elaborado pela autora.

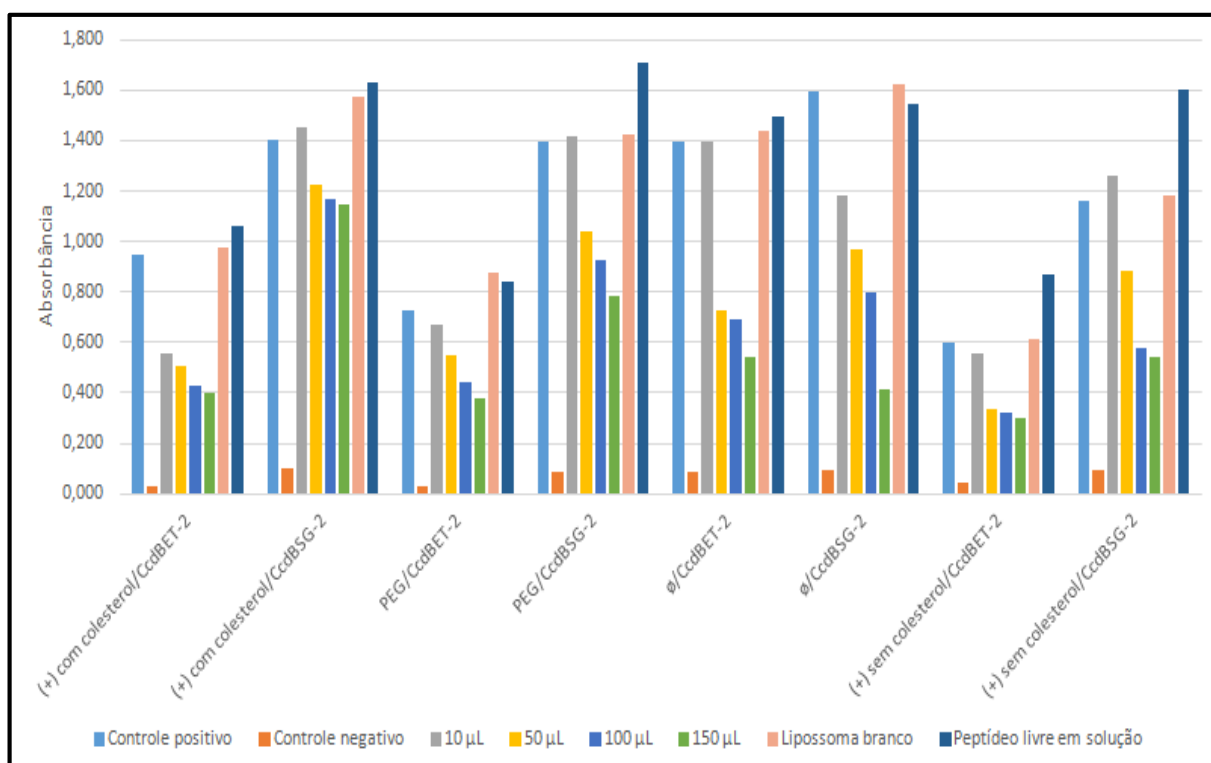
Tabela 10. Porcentagem de inibição de crescimento bacteriano para *Staphylococcus aureus* utilizando o análogo CcdBSG-2.

CcdBSG-2-2				
<i>Staphylococcus aureus</i>				
Volume	Lipossoma (+)	Lipossoma PEG	Lipossoma neutra	Lipossoma (+) sem colesterol
10 µL	0,00%	0,00%	5,06%	10,19%
50 µL	71,42%	36,26%	24,53%	73,50%
100 µL	75,30%	72,36%	60,53%	82,05%
150 µL	81,02%	52,33%	78,13%	77,88%

Fonte: Elaborado pela autora.

Pode-se perceber ao analisar os resultados referentes as Tabelas 11. e 12. que contra bactérias gram negativas, como no caso da *Escherichia coli* enterohemorrágica, o número de células indiretamente mortas não é tão elevado se comparado a bactérias gram positivas como o *Staphylococcus aureus* (Figura 14.). Observa-se que há uma porcentagem significativa de células que não sobreviveram, principalmente para a formulação neutra e PEG (Tabela 11 e 12.), indicando um melhor resultado quando os peptídeos são encapsulados em tais formulações. De maneira geral também pode-se dizer que o análogo CcdBET-2 é mais eficaz em promover a morte de células bacterianas se comparado ao CcdBSG-2. Os melhores sistemas peptídeo-lipossoma para bactérias gram negativas foram a formulação PEG encapsulada com CcdBET-2 e a formulação positiva encapsulada com CcdBET-2. Houve uma inibição de crescimento relevante em todos os ensaios realizados, indicando que o sistema peptídeo-lipossoma é eficaz e efetivo para causar a morte da bactéria. Mais uma vez pode-se concluir de forma geral que o sistema proposto como carreador do peptídeo para seu alvo celular funciona, sendo efetivo.

Figura 14. 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: Acervo pessoal.

Tabela 11. Porcentagem de inibição de crescimento bacteriano para *Escherichia coli* enterohemorrágica utilizando o análogo CcdBET-2.

CcdBET-2				
<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica				
Volume	Lipossoma (+)	Lipossoma PEG	Lipossoma neutra	Lipossoma (+) sem colesterol
10 µL	40,90%	7,32%	0,00%	6,98%
50 µL	46,40%	24,59%	48,02%	44,09%
100 µL	54,75%	38,39%	50,25%	46,25%
150 µL	57,92%	48,06%	61,23%	50,24%

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 12 Porcentagem de inibição de crescimento bacteriano para *Escherichia coli* enterohemorrágica utilizando o análogo CcdBSG-2.

CcdBSG-2				
<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica				
Volume	Lipossoma (+)	Lipossoma PEG	Lipossoma neutra	Lipossoma (+) sem colesterol
10 µL	0,00%	0,00%	26,06%	0,00%
50 µL	12,82%	25,55%	39,22%	23,68%
100 µL	16,67%	33,30%	49,93%	49,95%
150 µL	18,38%	43,51%	73,93%	53,48%

Fonte: Elaborado pela autora.

5. CONCLUSÃO

Como conclusão geral para este trabalho, pode-se dizer que lipossomas constituem um sistema de escolha para a aplicação, possivelmente clínica, de tais peptídeos, permitindo possível interação com a parede celular de bactérias e promovendo resultados positivos com relação a inibição do crescimento bacteriano. Pode-se dizer também que peptídeos encapsulados em lipossomas possuem atividade contra bactérias gram positivas de forma mais eficaz, e bactérias gram negativas de forma mais branda, mas que nesse caso, deve se melhorar e aperfeiçoar as formulações para que a inibição celular possa ser otimizada.

O método desenvolvido e proposto neste trabalho para a realização de tais ensaios de inibição celular foi de extrema importância para a conclusão e finalização dos estudos, permitindo que houvesse mais segurança e precisão nos resultados obtidos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAHAGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids J. Mol. Biol., v. 13, p. 238, 1965.
- BERNARD, P.; COUTURIER, M. Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. J. Mol. Biol., v. 226, n. 3, p. 735-745, 1992.
- CHANG, T. M. S. Semipermeable Microcapsules Science, v. 146, p. 524, 1964.
- CORBETT, K. D.; SCHOEFFLER, A. J.; THOMSEN, N. D.; BERGER, J. M. The structural basis for substrate specificity in DNA topoisomerase IV. J. Mol. Biol., v. 351, p. 545-561, 2005.
- COUTURIER, M.; BAHASSI, M.; VAN MELDEREN, L. Bacterial death by DNA gyrase: introduction of DNA cleavage and blocking of transcription. Trends in Microbiology, v. 6, p. 269-275, 1998.
- GARRIDO, S. S. Novos inibidores peptídicos de topoisomerasas bacterianas estruturalmente derivados da proteína CcdB. Pag. 26-33. Tese (Doutorado em Biotecnologia)-Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.
- GELLERT, M.; MIZZUCHI, K.; O'DEA, M. H.; NASH, H. DNA Gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, v. 73, n. 11, p. 3878-3876, 1976.
- GREGORIADIS, G.; LEATHWOOD, P. D.; RYMAN, B. E. Enzyme entrapment in liposomes. FEBS Lett., v. 14, p. 95, 1971.
- HASHIMI, S. M.; WALL, M. K.; SMITH, A. B.; MAXWELL, A.; BIRCH, R. G. Agents Chemother., 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.

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. **Anal. Bioch.**, 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.

LICHTENBERG, D.; BARENHOLDZ, Y. Liposomes, preparation, characterization and preservation. *Methods Biochem. Anal.*, v. 33, p. 337-462, 1988.

REECE, R.; MAXWELL, A. DNA gyrase: structure and function. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, v. 26, p. 335-375, 1991.

SARKER, S.D; NAHAR, L; KUMARASAMY, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. **Science Direct**, p.321-324, 2007.

SESSA, G.; WEISSMANN, G. **Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes.** *J. Lipid Res.*, v. 9, n. 310, 1968.

SILVEIRA, G. P.; NOME, F.; GESSER, J.C.; SÁ, M. M.; Estratégias usadas no combate a resistência bacteriana. **Quim. Nova**, Vol. 29, No. 4. 844-855, 2006.

TROVATTI, E. **Síntese e estudo de inibição da atividade da DNA girase por análogos peptídicos da toxina bacteriana CcdB.** 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.

WANG, H.; CHENG, H.; WANG, F.; WEI, D.; WANG, X. An improved 3-(4,5-demethylthiazol-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.

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

7. DADOS FINAIS

Araraquara, 24 de outubro de 2014.

De acordo,

Aluna: Carolina Reis Zambom

Orientador: Prof. Dr. Saulo Santesso Garrido